

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
1. Einleitung	4
1.1 Orale Mikroorganismen	4
1.2 Behandlung odontogener Infektionen	5
1.3 Photodynamische Therapie (PDT)	7
1.3.1 Geschichte der antimikrobiellen PDT	7
1.3.2 Funktionsweise der PDT	8
1.3.3 Die antibakterielle Photodynamische Therapie	10
1.3.4 Photosensibilisatoren	11
1.3.5 Wirksamkeit der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie	12
1.4 Chitosan	12
1.5 Fragestellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Bakterienkulturen	15
2.3 Chitosane	15
2.4 Photosensibilisatoren	16
2.5 Confocal Laser Scanning Microcopy (CLSM)	16
2.6 PDT-Protokoll	17
2.7 Datenanalyse und Statistik	17
3. Resultate	18
3.1 Ergebnisse für <i>S. sobrinus</i>	18
3.2 Ergebnisse für <i>C. gingivalis</i>	23
4. Diskussion	30
5. Referenzen	36
6. Danksagung	45
7. Lebenslauf	46

Zusammenfassung

Einleitung

Die Mundhöhle beherbergt natürlicherweise eine grosse Zahl von Mikroorganismen. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. mangelnder Hygiene oder unter medikamentöser Therapie, kann diese Mikroflora in ihrer Zusammensetzung beeinträchtigt und eine Quelle für Infekte der Mundhöhle, einschliesslich der Zähne, aber auch anderer Organe sein. Odontogene Infektionen werden zur Zeit durch mechanisches Debridement der Mikroorganismen, Desinfektion und/oder Antibiotika behandelt. Alternative Therapieschemata sind aber wünschenswert. Zu den neuen Behandlungsmethoden zählt die antimikrobielle Photodynamische Therapie (PDT), bei welcher eine unschädliche Substanz (sogenannte „Photosensibilisatoren“) durch Licht einer bestimmten Wellenlänge lokal aktiviert wird. Die dadurch ausgelöste Kaskade oxidativer Prozesse führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche die in der Nähe befindlichen Mikroorganismen zerstören. Diese Methode hat an verschiedenen Keimen, einschliesslich antibiotika-resistenter Stämme, guten Erfolg gezeigt, ist aber noch verbesserungswürdig. In der vorliegenden Studie wurde deshalb die Wirksamkeit einer neuartigen Kombination von antimikrobieller PDT mit verschiedenen Chitosan-Derivaten zur Therapie oraler Bakterien getestet.

Material und Methoden

Streptococcus sobrinus (Gram-positive Bakterien) und *Capnocytophaga gingivalis* (Gram-negative Bakterien) wurden als planktonische Kulturen unter Standardbedingungen gezüchtet. Anschliessend wurden die Keime mit den Photosensibilisatoren Hypericin oder Foslipos in verschiedenen Konzentrationen (0.6-5 µg/ml) für 15-30 Minuten alleine oder in Kombination mit den Chitosan-Derivaten Thioglykolsäure-Chitosan (TGA), Carboxymethyl-Chitosan (CMC), O-Carboxymethyl-Chitosan (OCMC), Dimethyl-Chitosan (DMC) und Trimethyl-Chitosan (TMC) im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden gewaschen, mit einer Polymerisationslampe (400-505 nm, 1070 mW/cm²) für 1 Minute bestrahlt und auf Agarplatten ausspiralisiert. Nach einer Wachstumsphase von 48 Stunden wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt. Alle Versuche wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die Wirkungen der Chitosan-Derivate, sowie der Hypericin- oder Foslipos-vermittelten PDT auf *S. sobrinus* und *C. gingivalis* wurde unter den gleichen Bedingungen auch alleine getestet. Mittels Confocal Laser Scanning Microscopy und Fluoreszenz-markierten Chitosan-Derivaten, bzw. Photosensibilisatoren wurde zusätzlich die Lokalisation der Chitosane und der Photosensibilisatoren an den beiden Bakterien-species untersucht.

Resultate

Bei *S. sobrinus* konnte sowohl Hypericin-, als auch Foslipos-vermittelte PDT die Koloniezahlen signifikant verringern, während unter den gleichen Bedingungen bei *C. gingivalis* kein Effekt erzielt werden konnte. Mikroskopische Studien zeigten, dass die

Photosensibilisatoren aber deutlich an beide Keime binden. Sowohl bei *S. sobrinus*, als auch bei *C. gingivalis* hatte die alleinige Inkubation mit TGA, TMC oder CMC keine Wirkung. OCMC tötete *C. gingivalis* komplett ab, hatte aber bei *S. sobrinus* aber keinen Effekt. DMC fiel im Medium aus. Mikroskopisch zeigte sich, dass bei *S. sobrinus* und *C. gingivalis* nur TGA, - bei letzterem Keim auch TMC -, klar an die Bakterien bindet. Bei der kombinierten Anwendung der Chitosane mit Hypericin oder Foslipos erwies sich nur TGA bei beiden Bakterien species als erfolgreich bei der Verstärkung der PDT-Wirkung, während die anderen untersuchten Chitosane keine Wirkung zeigten oder sogar zu einer Verschlechterung der PDT führten.

Schlussfolgerungen

Die Studie zeigt, dass die antimikrobielle PDT prinzipiell durch eine Kombination mit Chitosanen verbessert werden kann. Allerdings ist ein sorgfältiger Test notwendig, da verschiedene Chitosan-Derivate unterschiedliche Wirkung haben können. Die vorläufigen Ergebnisse an einem gram-positiven und einem gram-negativen Keim weisen darauf hin, dass TGA besonders geeignet sein könnte. Weiterführende Experimente an anderen (oralen) Microorganismen sind nun notwendig zur Unterstützung dieser Hypothese.

1. Einleitung

Die Arbeit befasst sich mit neuen Therapieansätzen zur Behandlung oraler Keime. Hierbei stand vor allem die Frage im Mittelpunkt, ob die antimikrobielle Photodynamische Therapie durch eine Kombination mit dem Biopolymer Chitosan verbessert werden könnte.

1.1 Orale Mikroorganismen

Der Mund hat, wie andere Körperstellen auch, eine natürliche Mikroflora. Diese ist so zusammengesetzt, dass sie mit dem Wirt harmonisch zusammenlebt. Jedoch kann sich diese mehr oder weniger stabile Beziehung verändern. Geschieht dies, können im Mund Krankheiten entstehen. Meist ist der Grund eine Störung der Mikroflora oder das unerwartete Auftreten von Bakterien an Stellen, die ihnen normalerweise nicht zugänglich sind. Die Störung kann von aussen kommen oder sie kann endogene Ursachen haben¹.

So beherbergt die Mundhöhle eine grosse Anzahl verschiedener Mikroorganismen, die eine komplexe Gemeinschaft bilden². Die meisten dieser Mikroorganismen sind ansässige (residente) Bakterien, die innerhalb eines Biofilms die Oberfläche der Mundhöhle kolonisieren^{3, 4}. Dabei handelt es sich um eine Mischflora, die unter anderem verschiedene Streptokokkenarten, Staphylokokken, Laktobazillen, Neisserien, diphtheroiden Stäbchen, Spirochäten, Fusobakterien, Bacteroides und Aktinomyzeten beherbergt. In dieser Mischflora wurden nebst den erwähnten Mikroorganismen auch Pilze, Protozoen und Viren isoliert⁵.

Ist diese endogene Flora intakt, bildet sie einen wichtigen Teil der menschlichen Gesundheit. Sie hilft die lokale und körpereigene Immunität aufrecht zu erhalten, steuert der Verdauung bei und unterbindet das Wachstum von gesundheitsschädlichen exogenen Pathogenen^{6, 7}. Die normale mikrobielle Umgebung des Mundes ist sehr fragil und ihr spezifisches Gleichgewicht kann beispielsweise durch schlechte Mundhygiene, Krankheiten oder Medikamente gestört werden. Dieser Zusammenhang zwischen Krankheiten und einer intakten Mundflora bzw. spezifischen Bakterien, die sich in der Mundhöhle ansiedeln können, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen³. Doch es wird auch erwähnt, dass im Gegensatz dazu noch überraschend wenig über die Mikroflora einer gesunden Mundhöhle bekannt ist³.

Da die Mikroflora der Mundhöhle so fragil ist, können bei entsprechenden prädisponierenden Bedingungen manche orale Mikroorganismen pathogen werden und/oder das Wachstum atypischer Spezies kann gefördert werden^{6, 8, 9}. Somit wird die Anzahl und Proportion der Mitglieder der gesunden Flora gestört. Durch das Ungleichgewicht können orale und dentale Infektionen ausgelöst werden. Diese aus der endogenen Flora der Mundhöhle entstandenen Infektionen spielen eine wichtige Rolle in der täglichen klinischen Praxis^{10, 11}.

Es ist seit langem bekannt, dass Mikroorganismen die Tendenz haben, auf Oberflächen Biofilme zu bilden. Dies ist besonders auch für den oralen Bereich gut untersucht und die gängigsten odontogenen Krankheiten entstehen auf Grund opportunistischer Bakterien des dentalen und oralen Biofilms^{12, 13}. Beispiele dafür sind die dentale Karies, Pulpitis, Parodontitis, akute/chronische apikale Parodontitis, periapikale Abszesse, Perikoronitis sowie Empyeme, Phlegmone und Logenabszesse, die mitunter zu lebensbedrohlichen Umständen führen können. Biofilme sind mikrobielle (meist multispezies) Gemeinschaften, deren Mitglieder in eine von ihnen produzierte extrazelluläre, polymere Matrix eingebettet sind und sich in dieser vermehren¹⁴. Dieses Konstrukt bietet den beteiligten Keimen Schutz, vermindert aber auch deutlich die Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen. Im Vergleich zu planktonischen wachsenden Keimen bilden Pathogene in Biofilmen somit eine schwer zu behandelnde Quelle für Infektionen im medizinischen Bereich. Deshalb ist es laut Aas et al. unabdingbar, dass die menschliche Mikroflora der Mundhöhle vollständig erforscht und bestimmt wird, um die Rolle der Bakterien bei oralen Erkrankungen verstehen zu können³.

1.2 Behandlung odontogener Infektionen

Die Mundflora von fast allen Patienten kann laut Peterson¹⁵ selbst einen odontogenen Infekt verursachen. Die üblichste Ursache odontogener Infektionen ist eine durch tiefe Karies verursachte Nekrose der Zahnpulpa, gefolgt von einer Bakterieninvasion durch das Pulpakavum in tieferes Gewebe. Nachdem die Bakterien in den Knochen eingedrungen sind, breitet sich die Infektion in alle Richtungen aus, bis sie die Corticalis erreicht¹⁵.

Gemäss Peterson¹⁵ können kaum nur die aeroben Bakterien solche Infekte verursachen. Laut ihm sind in 50% der Fälle allein anaerobe Bakterien die Verursacher eines odontogenen Infekts. Die anaeroben Bakterien überwiegen auch in Mehrfachinfektionen. Solche Mehrfachinfektionen entstehen bei nahezu allen Patienten aus einer Einzelinfektion heraus¹⁵.

Die aktuellen Behandlungen odontogener Krankheiten beinhalten meistens eine oder mehrere der folgenden Methoden: mechanisches Debridement der Mikroorganismen, Desinfektion und/oder Antibiotika². Zu beachten ist, dass eine unzureichende Behandlung oraler Infektionen nicht nur zu persistierenden lokalen Problemen führen kann, sondern auch das Risiko einer systemischen Ausbreitung der Bakterien oder derer Produkte mit sich bringt. Obwohl die kausalen Verbindungen zum Teil noch nicht vollends verstanden sind, wird angenommen, dass orale Infektionen zu Endokarditis, Diabetes mellitus, Hirnschlag, Frühgeburt und respiratorischen Krankheiten beitragen können^{16, 17}.

Auf Grund dieser möglichen Risiken sind bei der Behandlung odontogener Infektionen nach Peterson Antibiotika unabdingbar¹⁵. Jedoch müssen dabei die Antibiotika sorgfältig auf Grund des verursachenden Bakteriums ausgewählt werden. Es wird geschätzt, dass circa

10% aller verschriebenen Antibiotika in der Zahnmedizin auf Grund einer dentalen Infektion verabreicht werden¹⁸.

Weiter sind zur Behandlung diejenigen Antibiotika am effektivsten, die sowohl gegen Streptokokken (die den grössten Anteil ausmachen), als auch gegen eine Vielzahl anaerober Bakterien wirksam sind, da orale Infektionen oft Mischinfektionen sind.

Folgende Antibiotika sind bei einer oralen Verabreichung sehr effektiv¹⁵:

- Penicillin,
- Clindamycin,
- Metronidazole (alleine oder in Kombination mit Penicillin)
- Amoxicillin/Clavulansäure
- Erythromycin,
- Cephalexin und
- Tetracycline.

Bei parenteraler Verabreichung sind folgende Antibiotika sehr effektiv¹⁵:

- Penicillin,
- Clindamycin
- Metronidazol
- Cefacolin
- Cefoxitin

Trotz der vorhandenen Medikamente ist die Behandlung odontogener Infektionen wegen der grossen Anzahl verschiedener (endogenen) Pathogene, ihrer hohen Multiplikationsrate, der komplexen Topographie oraler Infektionen und des protektiven Charakters des Biofilmes gegenüber Medikamenten immer noch anspruchsvoll. Zudem ist auch im oralen Bereich die ansteigende bakterielle Resistenz (durch ein Wechselspiel von Mutation und Selektion oder durch Gen-Austausch von anderen Stämmen erworben) gegenüber Antibiotika alarmierend und erschwert die Behandlung zunehmend². Ausserdem besteht durch unsachgemässe und zu häufige Verwendung von Antibiotika bei zahnmedizinischen Routineeingriffen die Gefahr, dass im oralen Bereich laufend neue Resistenzen gebildet werden¹⁹. Rôças und Siqueira untersuchten Bakterienstämme infizierter Wurzelkanäle auf vorhandene Resistenzen gegen Beta-Laktame, Tetracycline und Makrolide. 32% der isolierten Stämme wiesen mindestens eines der 14 gesuchten Antibiotikaresistenz-Genen auf²⁰.

Antibiotika werden in der Zahnmedizin prophylaktisch sowohl prä-, intra- wie auch postoperativ eingesetzt. Damit soll verhindert werden, dass sich bei der Behandlung des Patienten Bakterien ausbreiten und ansiedeln können. Diese Behandlungsmethode wurde in verschiedenen klinischen Studien getestet. Einige Autoren haben festgestellt, dass Antibiotika sehr wirksam in der Prophylaxe wie auch in der Nachbehandlung von Wunden in der Mundhöhle sind. Die durch einen Infekt bedingten Komplikationen sind viel geringer bei

der Behandlung mit Antibiotika. Jedoch erwies sich das prophylaktische Verabreichen von Antibiotika bei der Behandlung von gesunden Menschen als nicht sinnvoll²¹⁻²⁴. Bei gesunden Patienten sind Antibiotika nur bei folgenden Behandlungen prophylaktisch notwendig:

- Beim Entfernen eines Zahns
- Bei periapikalen Operationen
- Beim Einsetzen von einem Knochenimplantat oder sonst einem Implantat
- Bei einer Knochentransplantation
- Beim Entfernen eines gutartigen Tumors

Hingegen sollten Menschen mit erhöhtem Risiko bei einer Operation prophylaktisch mit Antibiotika behandelt werden^{25, 26}. Ein erhöhtes Risiko bedeutet, dass die Patienten zu lokalen oder systemischen Infektionen neigen. Hierzu gehören Patienten mit einer metabolischen Erkrankung (wie zum Beispiel Diabetes) oder solche, die durch andere Einflüsse ein geschwächtes Immunsystem aufweisen. Ansonsten sollten Antibiotika nur dann verabreicht werden, wenn der Patient Anzeichen einer lokalen Entzündung aufweist, wie z.B. Fieber. Besonders vorsichtig sollte mit Antibiotika bei einer Schwangeren umgegangen und wenn möglich darauf verzichtet werden¹⁸.

Obwohl Antibiotika nach wie vor eine herausragende Rolle bei der antimikrobiellen Behandlung spielen, gibt es verstärkt Bestrebungen, alternative Therapieschemata zu entwickeln. Anlass hierfür war und ist vorallem die Beobachtung, dass immer mehr Keime Resistenzen gegenüber bestimmten Antibiotika entwickeln. Prinzipiell scheint diese Entwicklung mit einer zu häufigen oder falschen Anwendung von Antibiotika in der Klinik, der Veterinärmedizin oder der Landwirtschaft einher zu gehen²⁷. Zur besseren Überwachung der Resistenzentwicklung wurde in der Schweiz kürzlich eine entsprechende Datenbank etabliert (<http://www.search.ifik.unibe.ch/de/index.html>). Mit grosser Sorge wird international besonders die steigende Anzahl Gram-negativer Antibiotika-resistenter Pathogene beobachtet, für welche zur Zeit fast keine neuen Therapieregime in der Pipeline der Pharmaindustrie sind^{28, 29}.

Angesichts dieser Trends erhält eine seit über 100 Jahren bekannte antimikrobielle Methode neuen Aufschwung: die Photodynamische Therapie.

1.3 Photodynamische Therapie (PDT)

1.3.1 Geschichte der antimikrobiellen PDT

Die antimikrobielle Wirksamkeit der PDT verdankte seine Entdeckung vor gut 100 Jahren einem Zufall³⁰. Oscar Raab, ein Medizinstudent aus München, untersuchte damals die Effekte von Acridin-orange auf Malaria-verursachende Protozoen. Dabei stellte er fest, dass die Kombination von Acridinorange und Licht eine letale Wirkung auf Infusorien hatte. In

weiteren Experimenten konnten weder Acridin alleine noch Licht alleine diesen Effekt auslösen. Die Erkenntnis, dass die toxische Wirkung nicht durch das Licht, sondern durch ein chemisches Produkt der Fluoreszenz verursacht wird, führte somit zur Entdeckung des *Photodynamischen Effekts*³⁰.

Dies führte wenige Jahre danach zur ersten medizinischen Anwendung einer Interaktion eines fluoreszierenden Stoffs und Licht durch von Tappeiner, Leiter des pharmakologischen Instituts München. Dabei verwendete er eine Kombination von topisch aufgetragenem Eosin und weissem Licht zur Behandlung von Hauttumoren³⁰.

In den nachfolgenden Jahrzehnten wurde vor allem die Anwendung der PDT bei dermatologischen Erkrankungen untersucht. Der riesige Erfolg der ersten Antibiotika in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts führte dazu, dass die Entwicklung der antimikrobiellen PDT nicht weiter vorangetrieben wurde. Erst in jüngster Zeit – und bedingt durch das Aufkommen einer zunehmenden Zahl Antibiotika-resistenter Stämme – wurden die Prinzipien der antimikrobiellen Therapie erneut auf den Prüfstand gestellt. Erleichtert wurde diese Entwicklung auch durch die Verfügbarkeit besserer Lichtquellen und Photosensibilisatoren der neuen Generation. Dank der Entwicklung der Lasertechnologie taten sich in der Medizin unterschiedliche Anwendungsbereiche dafür auf. Sie wird zur Biostimulation und Förderung der Wundheilung eingesetzt aber auch im Bereich der Keimreduktion. So wurden verschiedene Anwendungen untersucht und in Studien getestet. Anfangs waren jedoch die Erfolge bei einer Bestrahlung einer Bakterienpopulation noch eher bescheiden. Erst in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts, als die Lasertechnologie mit anderen Methoden kombiniert wurde, stellten sich erste Erfolge ein³¹.

1.3.2 Funktionsweise der PDT

Prinzipiell wird bei der PDT eine untoxische, lichtaktivierbare Substanz (der sogenannte Photosensibilisator) systemisch oder lokal appliziert. Der Photosensibilisator reichert sich intrazellulär an und kann dann mittels Licht einer Photosensibilisator-spezifischen Wellenlänge lokal aktiviert werden^{32, 33}.

Durch die Bestrahlung des Photosensibilisators mit der Wellenlänge, die seinem Absorptionsmaximum entspricht, übernimmt der Farbstoff die Photonen-Energie³¹. Somit gerät der Photosensibilisator durch sichtbares Licht (400-750nm) in einen kurzlebigen Singulettzustand. Nun sind zwei Wege der biochemischen Reaktion möglich³⁴. Bei der Typ 1-Reaktion entstehen durch Elektronen- oder Wasserstoffatom-Transfer freie Radikale, die wiederum entweder mit Sauerstoff oder Biomolekülen reagieren und so durch molekulare Veränderungen zum Zelltod führen oder Photosensibilisatoren-Photoprodukte bilden, welche ebenfalls zytotoxisch sind. Bei der Typ 2-Reaktion gerät der Photosensibilisator durch "intersystem crossing" in einen langlebigen Triplettzustand. Durch Energietransfer auf

Biomoleküle und molekularen Sauerstoff werden Biomoleküle oxidiert und Singulett-Sauerstoff und andere Reactive Oxygen Species (ROS) gebildet, welche die vitalen Komponenten von Zellen zerstören können^{34, 35}. Singulett-Sauerstoff ist stark oxidierend und daher sehr toxisch. Dabei kann er massive Schädigungen an Zellmembranen und Nukleinsäuren verursachen. Da Singulett-Sauerstoff jedoch nur sehr kurzlebig ist (10^{-9} Sekunden) ist und in dieser Zeit nur ca. $0,1\ \mu\text{m}$ diffundieren kann wird der zelluläre Schaden auf das Gebiet beschränkt, wo der Photosensibilisator angereichert ist und durch das Licht aktiviert wird^{31, 34}. Die lokal begrenzte Bestrahlung bietet also einen strikt lokalen Behandlungsansatz, bei dem ein Minimum an gesundem Gewebe zerstört wird³².

Im unten stehenden Schema (Abb. 1) wird zusammengefasst, wie der Photosensibilisator bei einer PDT wirkt.

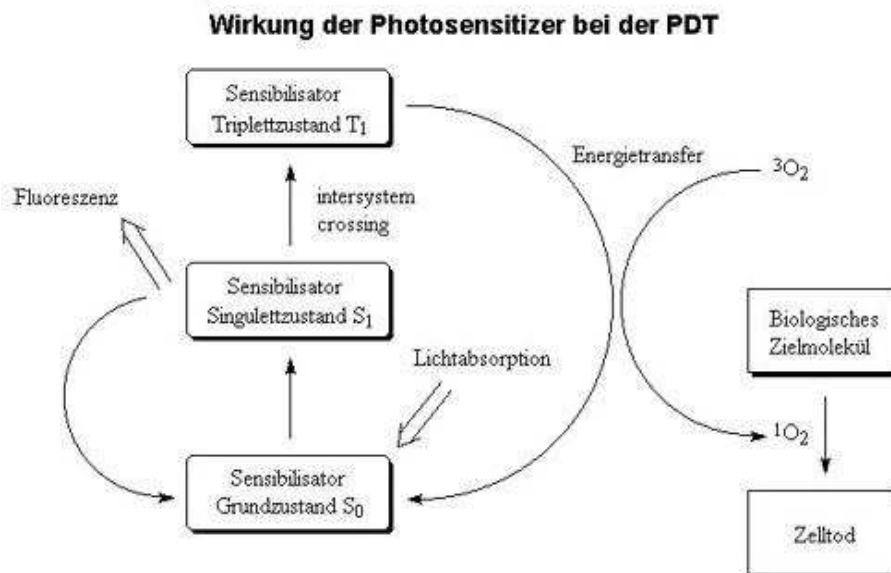


Abb. 1:

Schematische Darstellung der Wirkung der Photosensibilisatoren bei der PDT. (Quelle: www.chirurgie-mannheim.uni-hd.de)

Die PDT findet zur Zeit klinisch vorallem erfolgreich Anwendung bei Tumorpatienten, d.h. bei der Zerstörung von Krebszellen³⁶. Hierbei ist von Vorteil, dass Krebszellen (im Vergleich zu gesunden Zellen) aus noch nicht vollständig geklärten Gründen Photosensibilisatoren verstärkt anreichern.

1.3.3 Die antibakterielle Photodynamische Therapie

Ähnlich funktioniert das Prinzip in der Zahnmedizin. Hier wird jedoch von der antimikrobiellen PDT gesprochen, da die PDT nicht zur Zerstörung von Tumorgewebe sondern zum Abtöten von Bakterien genutzt wird. Prinzipiell folgt die antimikrobielle Behandlung durch PDT gleichen Prinzipien und es finden vergleichbare Prozesse statt, wie dies bei der PDT von Krebszellen beobachtet wurde (z.B. Verwendung der selben Photosensibilisatoren, bzw. mögliche Auslösung von Typ 1 und Typ 2 oxidativen Reaktionen)³⁷. Allerdings wurden auch Unterschiede gefunden, so z.B. dass die (kationische) Ladung der Photosensibilisatoren bei der PDT-Behandlung von Bakterien eine grössere Rolle spielt als bei Krebszellen³⁷. Ausserdem ist offenbar die Interaktion des Photosensibilisators mit der Target-Zelle (Krebszelle oder Keim) unterschiedlich und führt entweder zu einer intrazellulären Aufnahme (im Falle der Krebszelle) oder zu einer Bindung des Farbstoffs (im Falle von Keimen) an der Zellwand³⁷.

Grundsätzlich sind folgende drei Schritte für die antimikrobielle PDT notwendig:

- Photosensibilisatoren-Exposition der Bakterien bzw. der zu behandelnden Stelle
- Belichtung und Aktivierung des Photosensibilisators
- Bildung von Singulett Sauerstoff und die dadurch stattfindende Abtötung der Mikroorganismen

Es wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass antimikrobielle PDT die Abtötung von Bakterien und Pilzen, die bei Parodontitis, Endodontitis, Periimplantitis, Karies und Infektionen der Mundschleimhaut involviert sind, bewirken kann³⁸. Die Effektivität der antimikrobiellen PDT an Antibiotika-resistenten gram-positiven und gram-negativen Stämmen wurde auch bei oralen Spezies demonstriert³⁹ und es wurde von förderlichen immunmodulatorischen Effekten im Kontext oraler antimikrobieller PDT berichtet^{40, 41}. Laut Tilman ist eine starke Keimreduktion bei chronischer oder aggressiver Parodontitis und beginnender Periimplantitis bei der Gewebeaktivierung durch die antimikrobielle PDT zusätzlich zum Debridement ausschlaggebend für die schnelle Abheilung und Regeneration⁴². Ausserdem wird bei einer Behandlung mit der Methode der antimikrobiellen aPDT ein starker Rückgang der pathogenen Bakterien beobachtet⁴². Auch die parodontalen und periimplantären Sondierungstiefe sowie die Blutungsindex (ein Entzündungsindex) nehmen deutlich ab⁴². Da die antimikrobielle PDT sehr effektiv und nebenwirkungsfrei ist, kann sie beliebig oft angewendet werden. Gerade für Parodontitis und Periimplantitis ist diese Form der PDT eine wirksame ergänzende Therapie und kann auch prophylaktisch eingesetzt werden⁴².

Bei der oralen Anwendung der antimikrobiellen PDT gibt es zwei unterschiedliche PDT-Systeme. Die meisten funktionieren mit einer Laserlichtsonde, die subgingival (in die Taschen bzw. zu behandelnde Stelle) eingeführt wird. Diese Methode bringt mit sich, dass

man aus hygienischen Gründen eine Einwegsonde verwenden muss. Erschwerend kommt hinzu, dass oft enge Platzverhältnisse bei einer Behandlung einer infizierten Stelle vorzufinden sind und eine präzise Platzierung der Sondenspitze schwierig ist. Diesem Vorgehen gegenüber steht die transgingivale Methode. Dabei wird eine Glassonde von 8mm Durchmesser oral durch die Gingiva hindurch zum Taschengewebe appliziert³¹. Die nachfolgende Abb. 2 bildet die beiden Methoden ab.

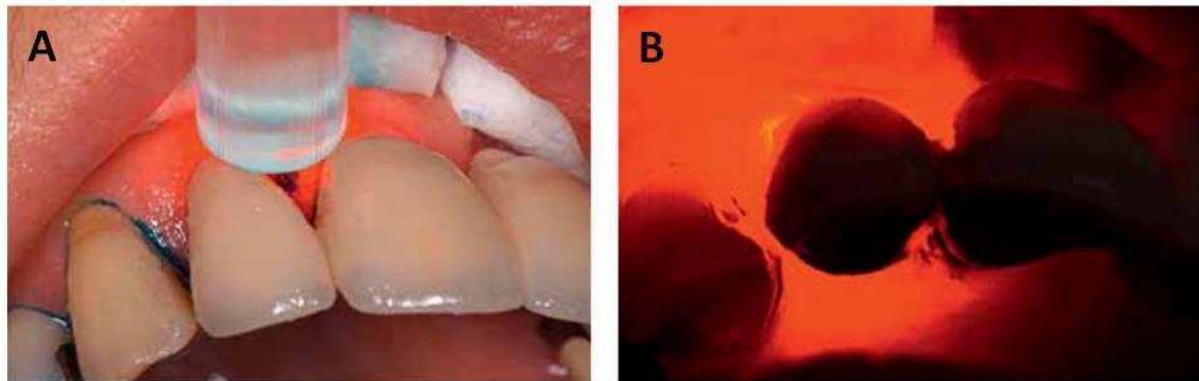


Abb. 2:

Verschiedene PDT-Systeme für die orale Anwendung: (A) transgingivale Belichtung, (B) Sondenspitze von bukkal in die approximale Tasche des Zahnes. (Bildquelle: ³¹)

1.3.4 Photosensibilisatoren

Als Photosensibilisatoren der neuen Generation werden überwiegend Prophyrine für antimikrobielle PDT eingesetzt⁴³. Diese gelten auf Grund ihrer grossen Affinität zur Lipidschicht der Bakterienzellwände als besonders wirksam. Jedoch müssen die Bakterien, die vernichtet werden sollen, direkt mit dem Photosensibilisator in Kontakt kommen. Dabei muss jedoch der Biofilm zerstört und weitgehend entfernt werden, damit der Farbstoff zu den Bakterien gelangen kann. Um zu verhindern, dass der Farbstoff in die Körperzellen gelangt, sollte der Photosensibilisator wieder herausgespült werden. Insgesamt wurde aber gezeigt, dass Körperzellen eine geringere Affinität zu Photosensibilisatoren haben, als Keim⁴³. Erst nach der Spülung mit einer physiologischen Lösung wird das Gebiet mit Licht bestrahlt³¹.

Bei der antimikrobiellen PDT in der Mundhöhle wurden bisher verschiedene Klassen von Photosensibilisatoren angewandt, wobei die Farbstoffe Methylenblau und Toluidinblau weitaus am besten untersucht sind. Aber auch andere Substanzen, wie Aminolävulinsäure (ALA), Photofrin, Erythrosin, Bengalrosa, Malachitgrün, meso-Tetrahydroxyphenyl Chlorin (mTHPC), verschiedene Phthalocyanine, Photogem oder Chlorin e6 Derivate sind als photoaktive Agentien potent^{44, 45}. Zudem wurde gezeigt, dass eine Kombination von

Hypericin mit dem liposomalen mTHPC Derivat Foslipos vorteilhaft für die Behandlung oraler multispezies Populationen sein könnte⁴⁶.

Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl Hypericin als auch ein liposomales mTHPC-Derivat als Photosensibilisator verwendet.

1.3.5 Wirksamkeit der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie

Trotz all dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde beobachtet, dass bestimmte orale Mikroorganismen – sogar planktonischer Kultur – nur gering empfindlich oder sogar resistent gegenüber einer PDT sind. Dies trifft vor allem auf verschiedene gram-negative Stämme oder Hefearten zu, die mit Zellwandstrukturen ausgestattet sind, welche die Adhäsion und/oder die Aufnahme der Photosensibilisatoren verhindern⁴⁷⁻⁴⁹.

Zahlreiche Studien zeigen aber auch auf, dass die photodynamische Therapie ein signifikantes klinisches Potenzial für die lokale Behandlung oraler Infektionen aufweist. Fontana et al.⁵⁰ konnten zeigen, dass bei Anwendungen der PDT 65% der Bakterien in der planktonischen Schicht abgetötet werden konnten. Hingegen war der Erfolg bei Mikroorganismen, die lediglich mit Licht behandelt wurden, mit 31% viel geringer. Auch wiesen Fontana et al. nach, dass die Bakterien im Biofilm bis zu 32% gegenüber einer Behandlung durch eine PDT resistent sind⁵⁰.

Es sollte betont werden, dass die antimikrobielle PDT in vielen Studien am Besten abschnitt, wenn sie mit anderen Modalitäten kombiniert wurde, da die Methoden verschiedene mikrobielle Spezies affektierten⁵¹⁻⁵⁵. Dies können konventionelle (mechanische oder desinfizierende) Methoden sein, aber auch Chitosane.

1.4 Chitosan

Chitosane wurden bisher in der Zahnmedizin aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung zur Vorbeugung von Karies verwendet^{56, 57}. Als funktionelles, erneuerbares, untoxisches und bioabbaubares Biopolymer wird Chitosan als Nahrungsmittelzusatz und für Kosmetika (v.a. zu deren Konservierung) verwendet^{58, 59}. Darüber hinaus eignet es sich als Carrier für Arzneimittel, Hautersatz, resorbierbare Wundnaht und Wundheilungsbeschleuniger⁶⁰⁻⁶². Im biomedizinischen Bereich gewann Chitosan wegen seiner antitumor, immunsystemstärkenden und hypocholesterolemischen Eigenschaften an Bedeutung⁶³. Eine wichtige Eigenheit von Chitosan und seinen chemischen Derivaten ist das weite Spektrum antimikrobieller Aktivitäten⁶³.

Chitosan wird aus Chitin mit Hilfe eines Enzyms synthetisiert⁶⁴. Chitin ist ein Polysaccharid, das als Bestandteil von Zellwänden in vielen Pilzen wie auch in einigen Krustentieren vorzufinden ist⁶⁵. Chitin ist somit ein nachwachsender Rohstoff und in grossen Mengen als Nebenprodukt aus der Pilzverarbeitung sowie in Form von Schalenabfällen von Garnelen,

Krebsen und anderen Krustentieren zu finden⁶⁶. Chitosan wurde zum erste Mal von Rouget 1859 nach intensiver alkalischer Behandlung von Chitin hergestellt⁶⁶. Der sowohl mechanische wie auch chemische Prozess wird in der kommerziellen Produktion nicht mit Hilfe eines Enzyms durchgeführt, obwohl auch eine enzymatische Herstellung möglich wäre⁶⁶.

Die Herstellung von Chitosan erfordert eine mehrstündige alkalische Hydrolyse. Dabei werden die Acetylreste der N-Acetyl-D-glucosamin-Bausteine abgespalten. Jedoch kommt es dabei auch zu einer partiellen Degradation der Ketten. Die Grenze zwischen Chitin und Chitosan ist kaum definierbar. Auf Grund dessen wird in der Regel von Chitosan gesprochen, wenn der Desacetylierungsgrad >40-50% beträgt und das Polymer in organischen Säuren löslich ist⁶⁶. Deshalb gilt der Begriff Chitosan als Sammelbezeichnung für eine sehr heterogene Gruppe von Chitinderivaten⁶⁶. Chitosan ist somit ein natürliches kationisches Polysaccharid und wird durch partielle oder vollständige Deacetylierung von Chitin produziert⁶⁷.

Auf der folgenden Darstellung (Abb. 3) wird die chemisch Veränderung durch die Synthese schematisch veranschaulicht.

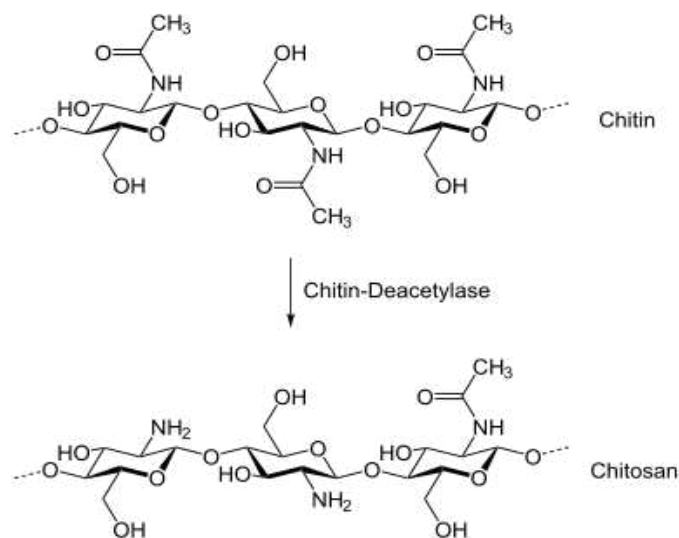


Abb. 3:

Schematische Darstellung der enzymatischen Synthese von Chitosan (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Chitosan>).

In der Medizin haben sich Chitosan und Chitosanderivate in der Wundversorgung bewährt, da sie atmungsaktive und feuchtigkeitsdurchlässige Membranen bilden⁶⁶.

In der Zahnmedizin wurde im Kontext oraler Infektionen über Chitosane berichtet, dass sie wirksam das Wachstum, die Viabilität und/oder die Adhäsion vorallem von gram-positiven Bakterien und Pilzen, sowie in geringerem Umfang auch von gram-negativen Bakterien hemmen^{56, 68-77}

Die antimikrobielle Wirksamkeit von Chitosan wird durch folgende Faktoren beeinflusst⁷⁸⁻⁸⁰:

- Mikrobielle Faktoren (Art der Mikroorganismen sowie Zellalter),
- Intrinsische Faktoren von Chitosan:
 - positive Ladungsdichte,
 - Molekulargewicht,
 - Konzentration,
 - hydrophiler/hydrophober Eigenschaft und
 - Chelationskapazität
- Dem physikalischen Zustand: wasserlöslicher und fester Zustand von Chitosan
- Umgebungsbedingten Faktoren:
 - Ionendichte im Medium
 - Temperatur
 - pH-Wert
 - Reaktionszeit

Trotz potenter antibakterieller und antiplaque Eigenschaften ist die Anwendung von Chitosan als chemisches Agens für Mundwasser oder Zahnpasten durch die Unlöslichkeit in Wasser limitiert⁸¹. Der genaue Mechanismus des antibakteriellen Vorgangs von Chitosan und dessen Derivaten ist noch unbekannt⁸¹.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Antibiotika-resistente Pathogene stellen ein zunehmendes Problem in der klinischen Praxis dar. Als eine alternative Behandlungsmethode bietet sich die antimikrobielle PDT an, da sie auf komplett anderen Wirkmechanismen beruht, wie Antibiotika. Trotz eines grossen Angebots an Photosensibilisatoren und einer Vielzahl von Studien konnte sich diese Methode aber bis jetzt nicht etablieren. Dies liegt u.a. daran, dass offenbar nur ein gewisses Spektrum an Keimen (vor allem Gram-positive Bakterien) ausreichend auf diese Behandlung ansprechen.

In der vorliegenden Studie wurde deshalb untersucht, ob eine antimikrobielle PDT durch den Zusatz von Chitosan verbessert werden kann. Chitosan ist ein Biopolymer, welches u.a. permeabilitätsfördernde und antimikrobielle Effekte besitzt. Die Ergebnisse unserer Studie,

welche in den Modell-Organismen *Streptococcus sobrinus* (Gram-positiv) und *Capnocytophaga gingivalis* (Gram-negativ) gewonnen wurden, weisen darauf hin, dass die vorgeschlagene Kombinationstherapie von Vorteil sein kann.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma, Buchs, Schweiz bezogen.

2.2 Bakterienkulturen

Alle Mikroorganismen (*Streptococcus sobrinus*, OMZ 176, und *Capnocytophaga gingivalis*, OMZ 289) stammen aus der Bakterienkultursammlung des Instituts für Orale Biologie, Zentrum für Zahnmedizin, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz. Die Bakterien wurden jeweils über Nacht in FUM (fluid universal medium) bei 37°C aerob (OMZ 176) bzw. anaerob (OMZ 289) bis zur späten log-Phase angezüchtet.

FUM-Zusammensetzung setzte sich wie folgt zusammen: (auf einen Liter destilliertes Wasser): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 3 g Glukose, 2 mg Hemin, 1 mg Memadion, 0.5 g Cystein-Hydrochlorid, 0.1 g Dithiothreitol, 2.9 g NaCl, 0.5 g Na₂CO₃, 1 g KNO₃, 0.45 g K₂HPO₄, 0.45 g KH₂PO₄, 0.9 g (NH₄)₂SO₄ und 0.188 g MgSO₄*7H₂O; pH 7,1. Zuletzt wurde hitzeinaktiviertes und filtersterilisiertes Pferde-Serum (Endkonzentration 10%) dazugegeben.

2.3 Chitosane

In der Studie wurden sechs verschiedene Chitosan-Derivate getestet: Thioglykolsäure-Chitosan (TGA) low molecular weight (LMW-TGA) und medium-molecular weight (MMW-TGA), Carboxymethyl-Chitosan (CMC), O-Carboxymethyl-Chitosan (OCMC), Dimethyl-Chitosan (DMC) und Trimethyl-Chitosan (TMC). Zusätzlich wurden für mikroskopischen Studien Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) -gelabelte Version vier dieser Chitosane benutzt (FITC-LMW-TGA, FITC-MMW-TGA, FITC-CMC, FITC-OCMC, FITC-TMC). Für die mikrobiologischen und die mikroskopischen Experimente wurden die Chitosane jeweils in 0.9% NaCl gelöst und mit FUM zu einer Stocklösung von 4 mg/ml angemischt. Diese wurde durch eine 1:1 Verdünnungsreihe in FUM zu Chitosan-Lösungen von 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml und 0.25 mg/ml weiterverdünnt.

Alle in dieser Studie verwendeten Chitosane wurden freundlicherweise vom Institut der Anorganischen Chemie der Universität Zürich (Prof. Greta R. Patzke, Georg Geisberger) zur Verfügung gestellt. Dort wurde auch das Zeta Potenzial der Chitosane bestimmt.

2.4 Photosensibilisatoren

Foslipos (FOS), stammt von Biolitec, Jena, Deutschland. Es handelt sich um ein liposomales (eingekapselt in dipalmitoylphosphatidylcholine/ dipalmitoylphosphatidyl-glycerol (DPPC/DPPG) Liposomen) und ungeladenes Derivat von meso-Tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC), das in destilliertem Wasser auf eine Stocklösung von 1.5 mg/ml angemischt wurde. Hypericin (HYP) wurde von Invitrogen (Basel, Schweiz) erworben und in 100% Ethanol zu einer Stocklösung von 1 mg/ml gelöst.

Alle Stocklösungen wurden dunkel bei 4°C gelagert und jeweils nach Bedarf wie unten beschrieben mit FUM weiterverdünnt.

2.5 Confocal Laser Scanning Microcopy (CLSM)

S. sobrinus wurde entweder mit HYP (Endkonzentrationen: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FOS (Endkonzentrationen: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FITC-CMC (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml), FITC-OCMC (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml), FITC-TGA (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml) oder mit einer Mischung von FITC-CMC (Endkonzentration: 4mg/ml) zusammen mit HYP (Endkonzentration: 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder FOS (Endkonzentration: 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei war die Inkubationsdauer für die Chitosan-Samples 30 Minuten, für die Photosensibilisator-Samples 15 Minuten und für die Photosensibilisator-Chitosan-Mischung (sowohl mit, als auch ohne 15 min Vorinkubation mit dem jeweiligen Chitosan) 15 Minuten.

C. gingivalis wurde entweder mit HYP (Endkonzentrationen: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FOS (Endkonzentrationen: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FITC-OCMC (Endkonzentrationen: 4 mg/ml), FITC-MMW-TGA (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml), FITC-LMW-TGA (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml), FITC-DMC (Endkonzentration: 4mg/ml), FITC-TMC (Endkonzentration: 4 mg/ml), FITC-CMC (Endkonzentrationen: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml), oder mit einer Mischung von FITC-OCMC (Endkonzentration: 4 mg/ml), FITC-TGA (Endkonzentration: 4 mg/ml), FITC-DMC (Endkonzentration: 4 mg/ml) oder FITC-TMC (Endkonzentration: 4 mg/ml) zusammen mit HYP (Endkonzentrationen: 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder FOS (Endkonzentrationen: 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Chitosan-Samples wurden 30 Minuten inkubiert, die Photosensibilisator-Samples und die gemischten Photosensibilisator-Chitosan-Samples (nach 15 min Vorinkubation mit dem jeweiligen Chitosan) 15 Minuten.

Danach wurden alle die Proben zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet, mit Feuer fixiert und mit Glycergel eingedeckt (Dako, Glostrup, Dänemark). Zur Analyse wurde ein CLSM (TCS SP2 und SP5, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

2.6 PDT-Protokoll

Die Dichte der planktonisch gezüchteten Bakterien wurde durch Spektrophotometrie bei 550 nm bestimmt und auf eine optische Dichte von 0.9-1.1 gebracht. Die Bakterienlösung wurde in Tubes von jeweils 100 µl bei 13000 Umdrehungen pro Minute eine Minute lang zentrifugiert und überständiges FUM wurde abgesaugt. Danach wurden die Bakterien entweder mit HYP (Endkonzentrationen: 0.6 – 5 µg/ml), FOS (Endkonzentrationen: 0.6 – 5 µg/ml), CMC (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml), MMW-TGA (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml), LMW-TGA (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml), OCMC (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml), DMC (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml), TMC (Endkonzentrationen: 0.5 – 4 mg/ml) oder mit einer Mischung von jeweils einem dieser sechs Chitosane (in oben angegebenen Endkonzentrationen) und HYP (in oben angegebenen Endkonzentrationen) oder FOS (in oben angegebenen Endkonzentrationen) im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Chitosan-Samples wurden 30 Minuten inkubiert, die Photosensibilisator-Samples und die Photosensibilisator-Chitosan-Samples (sowohl mit, als auch ohne 15 min Vorinkubation mit dem jeweiligen Chitosan) 15 Minuten.

Die Bakterien wurden zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und alle Proben, welche Photosensibilisatoren enthielten (ausschliesslich der Dunkeltoxizitäts-Kontrollen), wurden durch ein Halogenpolymerisationsgerät (Optilux500, KerrHawe, Bioggio, Schweiz) 60s mit sichtbarem Licht beleuchtet. Dies geschah mit einer Entfernung von 3cm zur Kulturoberfläche. Laut Herstellerangaben hat die Polymerisationslampe eine Wellenlänge von 400-505nm und eine Intensität von 1070 mW/cm². Danach wurden folgende Verdünnungsreihen aller Samples in physiologischer NaCl-Lösung angefertigt. Für die Kontrollen: unverdünnt und 10⁻³, für alle übrigen Samples: unverdünnt, 10⁻² und 10⁻³. Diese Verdünnungsreihen wurden anschliessend auf Blutagarplatten (Columbia Blood Agar Base Becton, Dickinson and Co., Le Pont de Claix, France), welche mit 5 % Menschenblut ergänzt wurden, ausspiralisiert. Nach zwei (*S. sobrinus*), respektive drei Tagen (*C. gingivalis*) Inkubation wurden die CFU (colony forming units) gezählt.

2.7 Datenanalyse und Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreifach ausgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>), unter Verwendung von one-way ANOVA und Tukey's t-test. $P \leq 0.05$ wurden als signifikant angenommen. Die Daten sind in Mittelwerten von drei bis sechs Werten mit Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben. Die Werte sind gegenüber den Kontrollen normalisiert (welche auf 100% gesetzt wurden) und als prozentualer Anteil überlebender Mikroorganismen oder getöteter Mikroorganismen bezüglich unbehandelter Kontrollen dargestellt.

3. Resultate

3.1 Ergebnisse für *S. sobrinus*

Zunächst wurden für *S. sobrinus* die optimalen photodynamischen Konzentrationen für die Verwendung der Photosensibilisatoren HYP und FOS sowie Inkubationszeiten von 15 min und 60 s Bestrahlung mit einer Polymerisationslampe ermittelt. Ausgehend von Vordaten⁴⁶ wurden hierfür Photosensibilisator-Konzentrationen von 0.6 und 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Wie in Abbildung 4 ersichtlich und in Übereinstimmung mit den Vordaten zeigte sich, dass der PDT-Effekt sowohl von HYP, als auch von FOS dosisabhängig war. HYP-PDT wies hierbei bei gleichen Konzentrationen einen stärkeren antibakteriellen Effekt auf, als FOS-PDT. Unbehandelte Kontrollen wiesen einen Durchschnittswert von 7.36×10^7 CFU/ml (colony forming units pro ml) auf. Bei einer Konzentration von 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HYP verringerten sich nach PDT die CFU auf durchschnittlich 3.72×10^4 CFU und bei 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FOS auf 6.78×10^5 CFU. Bei einer Konzentration von 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zählten wir nach HYP-PDT durchschnittlich 1.62×10^5 CFU und nach FOS-PDT 1.29×10^7 CFU.

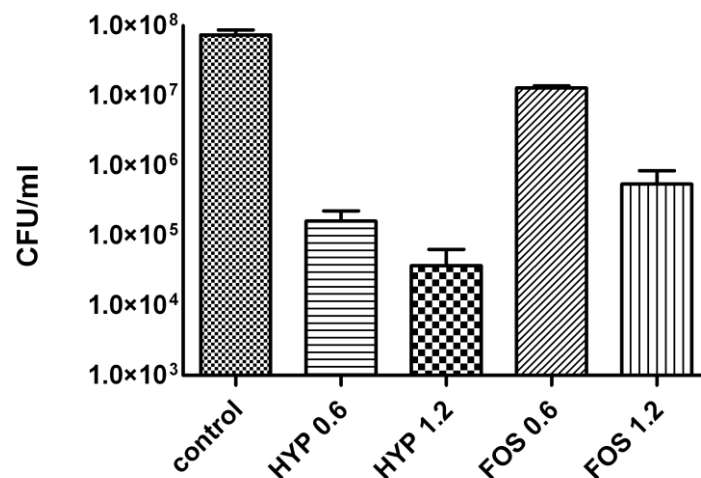


Abb. 4:

Colony Forming Assays: photodynamische Effekte auf *Streptococcus sobrinus* nach 15 min Inkubation mit 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hypericin (HYP) oder Foslipos (FOS) und 60 s Bestrahlung (400-505 nm).

Sowohl HYP, als auch FOS fluoreszieren im Rotbereich und können deshalb fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Mit Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) waren starke Fluoreszenzsignale sowohl für HYP, als auch für FOS an *S. sobrinus* nach 30 Minuten Inkubation (ohne Belichtung) zu erkennen (Abb. 5).

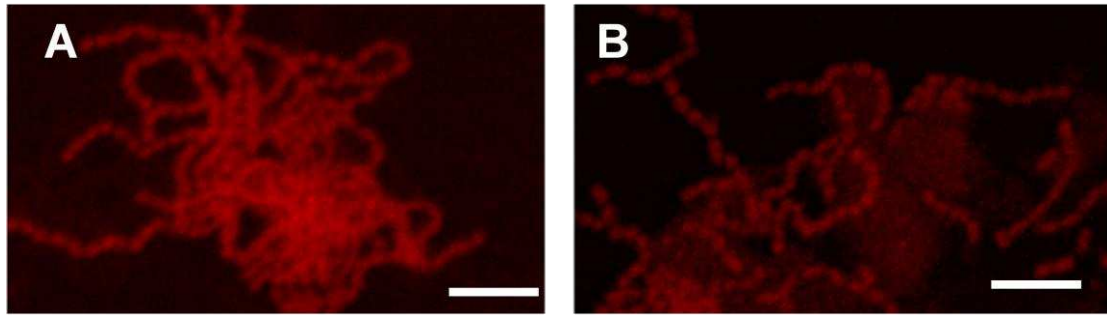


Abb. 5:

Confocal Laser Scanning Microscopy: *Streptococcus sobrinus* nach 30 minütiger Inkubation mit Hypericin (A) und Foslipos (B). Massstab = 5 μ m.

Als nächstes wurden die in dieser Studie eingeschlossenen Chitosan-Derivate einzeln auf ihre mögliche antibakterielle Wirkung getestet. Die maximale Konzentration, welche hierbei verwendet wurde, lag bei 4 mg/ml. Höhere Konzentrationen waren nicht möglich, da die Löslichkeit der Chitosane dann nicht mehr gegeben war.

Erste Versuche zeigten ausserdem, dass sowohl DMC, als auch OCMC bei Verdünnung im Zellkulturmedium (FUM) rasch ausfiel und nicht wieder in Lösung zu bringen war. Wir haben deshalb auf die weitere Verwendung dieser beiden Chitosane für unsere Studie verzichtet.

Unsere Versuche zeigten, dass TMC auch bei den höchsten möglichen Konzentrationen die Zahl der CFU nicht signifikant reduzieren konnte. Sämtliche beobachteten Reduktionen waren weniger als 1 \log_{10} (Abb. 6).

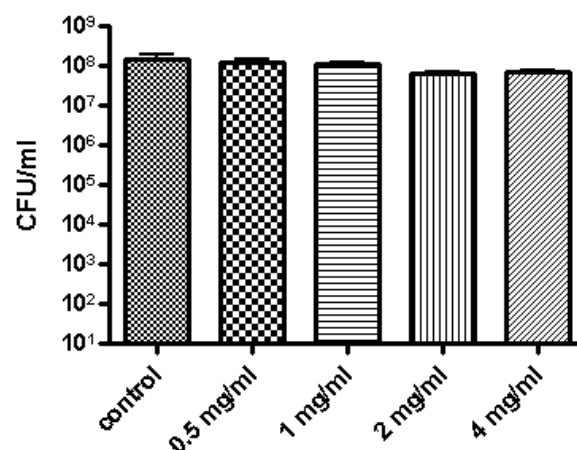


Abb. 6:

Colony Forming Assays: Effekte von TMC auf *Streptococcus sobrinus* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Dies traf auch auf CMC zu. Die Reduktionen der CFU waren zwar höher als bei TMC, überstiegen aber die $2 \log_{10}$ bei keiner der getesteten Konzentrationen (Abb. 7).

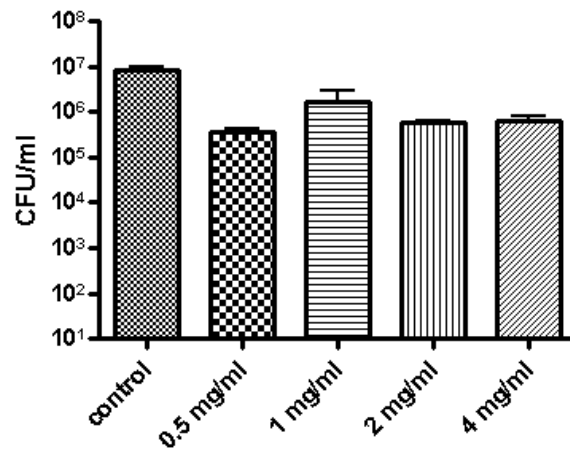


Abb. 7:

Colony Forming Assays: Effekte von CMC auf *Streptococcus sobrinus* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Inkubationen mit TGA führten unter unseren Versuchsbedingungen auch nicht zu signifikanten Verminderungen der CFU (Abb. 8).

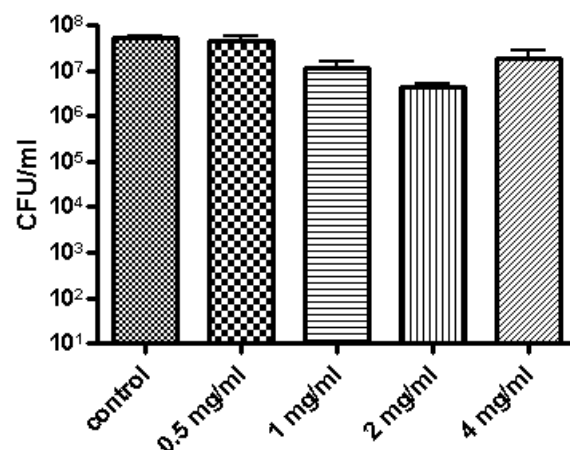


Abb. 8:

Colony Forming Assays: Effekte von TGA auf *Streptococcus sobrinus* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Um Informationen zu den Interaktionen der verwendeten Substanzen mit den Keimen zu erhalten, haben wir mikroskopische Untersuchungen mit konfokaler Mikroskopie (CLSM) gemacht. Zum Einsatz kamen hierfür FITC-gelabelte Chitosane. Die Analysen zeigten ein heterogenes Bild, in Abhängigkeit vom verwendeten Chitosan (Abb. 9). So waren lediglich sehr schwache Fluoreszenzsignale für TMC an *S. sobrinus* zu detektieren (Abb. 9A), während nach Inkubation mit FITC-CMC eine stärkere Fluoreszenz nachweisbar war. Diese hatte aber teilweise ein aggregiertes Erscheinungsbild und nicht immer waren die Keime mit ihr assoziiert (Abb. 9B). Im Unterschied zu TMC und CMC war die TGA-Fluoreszenz stark und deutlich den Keimen zugeordnet (Abb. 9C).

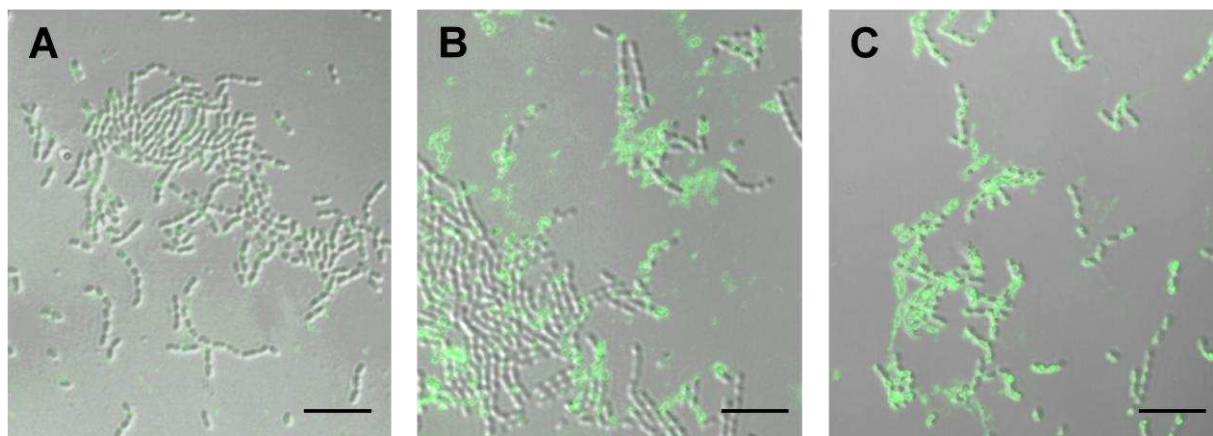


Abb. 9:

Confocale Laser Scanning Microscopy: *Streptococcus sobrinus* nach 30 min Inkubation mit Fluoreszenz-gelabeltem TMC (A), CMC (B) und TGA (C). Massstab = 10 μ m.

Um zu überprüfen, ob Chitosan-Derivate die Wirkung der PDT verstärken können, haben wir exemplarisch die Kombination von CMC oder TGA (d.h. diejenigen Chitosane mit der stärksten Wirkung im CFU-Assay) für die PDT entweder mit HYP oder mit FOS untersucht. Ausserdem wurden zwei Protokolle verglichen: einerseits wurden die Bakterien zuerst 15 Minuten mit dem Chitosan vorinkubiert, bevor man für weitere 15 Minuten den Photosensibilisator (HYP oder FOS) dazugab, andererseits wurden das Chitosan und der Photosensibilisator (HYP oder FOS) zusammen für 15 Minuten inkubiert.

Die Ergebnisse der CFU-Assays zeigten, dass die Kombination von CMC und PDT den Outcome der PDT signifikant verschlechterte ($p < 0.05$; Abb 10). Dies war unabhängig davon, ob CMC vorinkubiert oder zusammen mit den Photosensibilisator appliziert wurde und auch unabhängig von dem verwendeten Photosensibilisator (HYP oder FOS) (Abb 10).

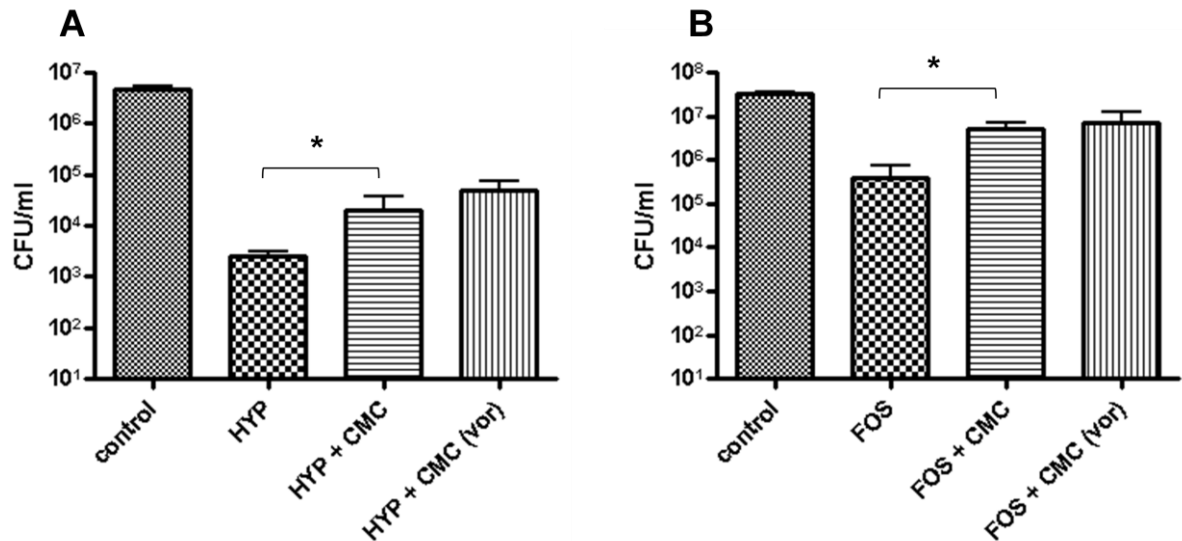


Abb. 10:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Streptococcus sobrinus* nach 15 min Inkubation mit 1.2 μ M/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) oder einem Gemisch der Photosensitizer (Endkonzentration jeweils 1.2 μ M/ml) und CMC (Endkonzentration 4mg/ml) sowohl mit, als auch ohne 15 minütiger Vorinkubation mit CMC. * $p < 0.05$.

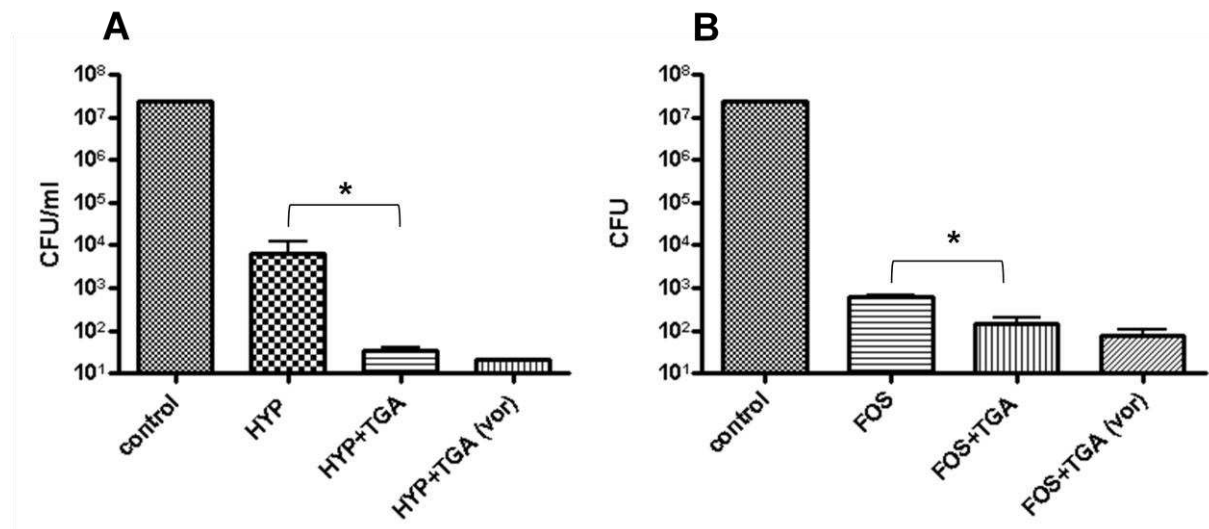


Abb. 11:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Streptococcus sobrinus* nach 15 min Inkubation mit 0.6 μ M/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) oder einem Gemisch der Photosensitizer (Endkonzentrationen jeweils 0.6 μ M/ml) und TGA (Endkonzentration 4mg/ml) sowohl mit, als auch ohne 15 minütiger Vorinkubation mit TGA. * $p < 0.05$.

Der Zusatz von TGA hingegen verbesserte sowohl die PDT mit HYP, als auch mit FOS signifikant ($p < 0.05$). Auch dies war unabhängig davon, ob der Photosensibilisator einzeln oder zusammen mit dem Chitosan inkubiert wurde (Abb. 11). Der Unterschied zwischen den Ergebnissen mit und ohne Vorinkubation des TGA war nicht signifikant.

3.2 Ergebnisse für *C. gingivalis*

Da für *C. gingivalis* noch keine Vordaten zur PDT mit HYP oder FOS vorlagen, haben wir zunächst die entsprechenden Parameter etabliert. Dunkeltoxische Experimente (d.h. ohne Lichtaktivierung des Photosensibilisators) zeigten, dass es bei Inkubationen mit HYP oder FOS mit Konzentrationen zwischen 0.6 – 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht zu einer signifikanten Verringerung der CFU bei *C. gingivalis* kam (Abb. 12).

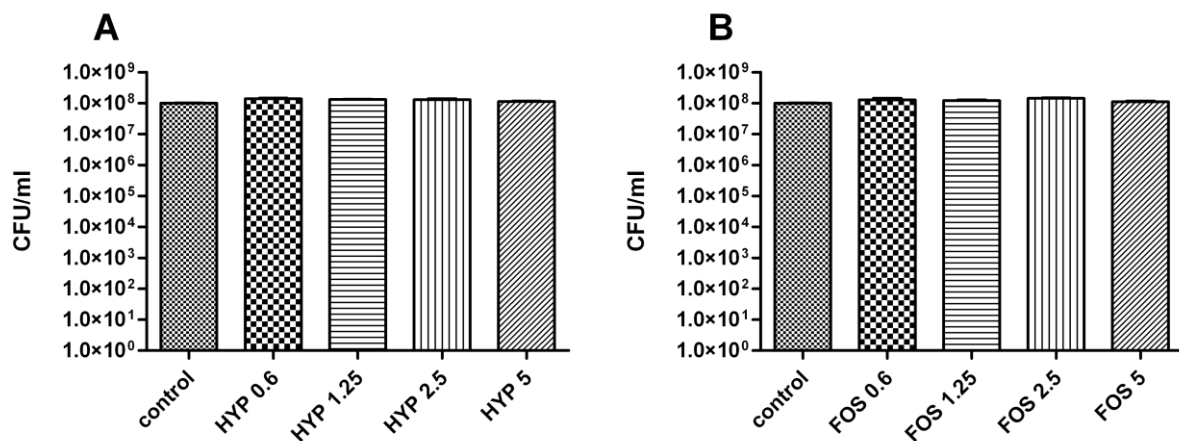


Abb. 12:

Colony forming assays bei *Capnocytophaga gingivalis*: Dunkeltoxizität von HYP (A) und FOS (B) nach Inkubation mit 0.6, 1.25, 2.5 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Photosensibilisators bei *Capnocytophaga gingivalis* nach 15 min Inkubation.

Die nachfolgenden PDT-Experimente nach Inkubation mit verschiedenen nicht-dunkeltoxischen Konzentrationen von HYP und FOS (und Lichtaktivierung) zeigten nur einen geringen antimikrobiellen Effekt bei *C. gingivalis* (Abb. 13).

Um zusätzliche Informationen über mögliche Interaktionen der Photosensibilisatoren HYP und FOS mit den Bakterien zu erhalten, wurde nach Inkubation mit FOS oder HYP eine CLSM durchgeführt. Wie in Abb. 14 ersichtlich, lagerten sich beide Photosensibilisatoren an *C. gingivalis* an.

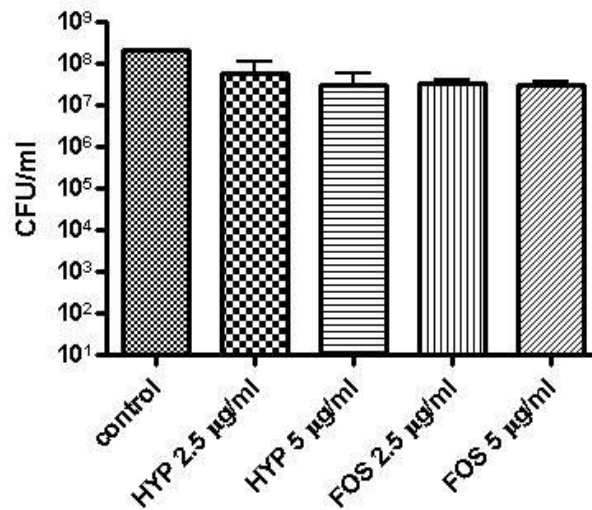


Abb. 13:

Colony forming assays bei *Capnocytophaga gingivalis*: PDT-Effekte nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Hypericin (HYP) und Foslipos (FOS).

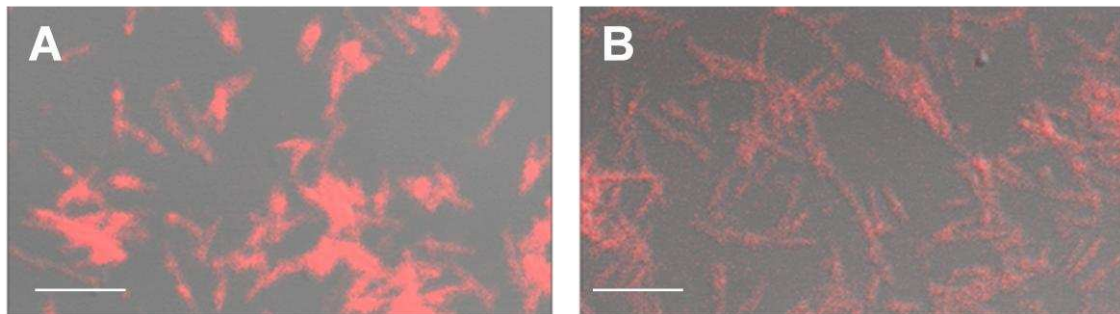


Abb. 14:

Confocal Laser Scanning Microscopy: *Capnocytophaga gingivalis* nach 30 minütiger Inkubation mit Hypericin (A) und Foslipos (B). Photosensibilisatoren fluoreszieren jeweils in rot. Massstab = 5 µm.

Anschliessend haben wir mögliche antibakterielle Wirkungen der Chitosan-Derivate alleine getestet. Inkubationen mit TMC zeigten bei keiner der verwendeten Konzentrationen (0.5 – 4 mg/ml) relevante Effekte auf die Viabilität von *C. gingivalis* (Abb. 15).

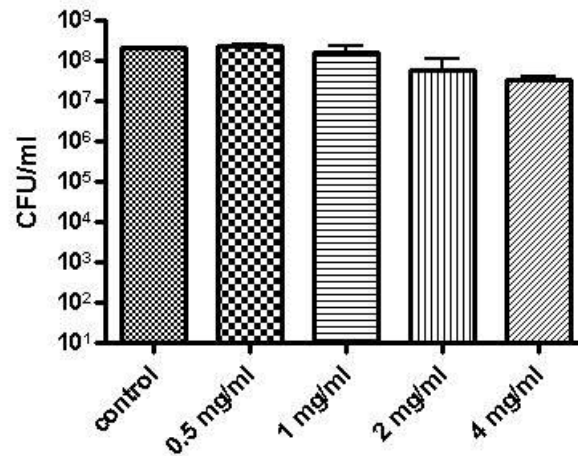


Abb. 15:

Colony forming assays bei *Capnocytophaga gingivalis*: Effekte von TMC nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Weitere CFU-Assays zeigten, dass auch CMC bei Dosierungen von 0.5 – 4 mg/ml keine signifikante Verringerung der Kolonie-Zahlen im Vergleich zu den Kontrollen bewirkte (Abb. 16). Es zeigte sich sogar ein leichter (aber statistisch nicht signifikanter) Trend zu einer höheren Koloniezahl nach Inkubation mit diesem Derivat.

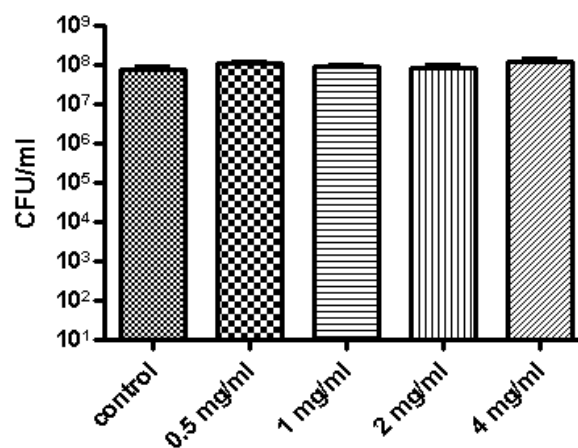


Abb. 16:

Colony Forming Assays: Effekte von CMC auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Ähnliche Ergebnisse erzielten wir auch mit TGA: Inkubationen mit diesem Chitosan führten nicht zu einer signifikant verringerten Zahl von CFU verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (Abb. 17).

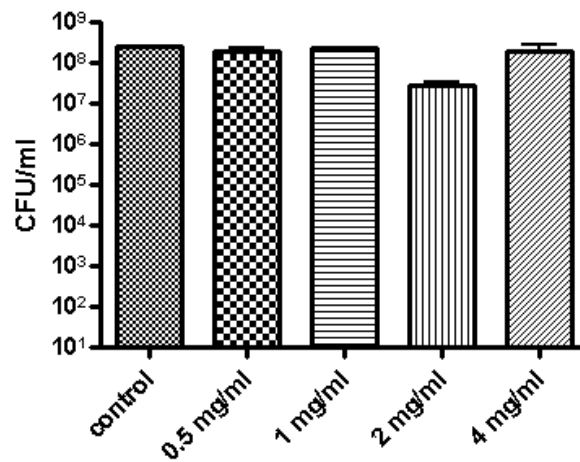


Abb. 17:

Colony Forming Assays: Effekte von TGA auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml.

Überraschenderweise ergab die Exposition von *C. gingivalis* mit dem Chitosan-Derivat OCMC jedoch eine signifikante Reduktion der Koloniezahlen ab einer Konzentration von lediglich 0.5 mg/ml (Abb. 18). Eine Konzentration von 4 mg/ml führte sogar zu einer kompletten Auslöschung dieses Keims in der Kultur (Abb. 18).

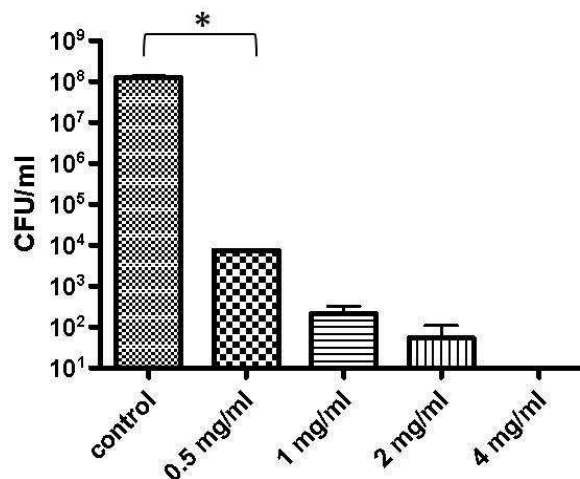


Abb. 18:

Colony Forming Assays: Effekte von OCMC auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 30 min Inkubation mit Konzentrationen von 0.5 – 4 mg/ml. * $p < 0.05$.

Mikroskopische Analysen zeigten, dass sich FITC-CMC und FITC-OCMC nach einer Inkubation von 30 min kaum (OCMC) oder nicht (CMC) sichtbar an *C. gingivalis* anlagern (Abb. 19, A und B). Wie auf diesen Abbildungen ersichtlich, wiesen beide Chitosan-Derivate ausserdem eine starke Tendenz auf, im Medium auszufallen.

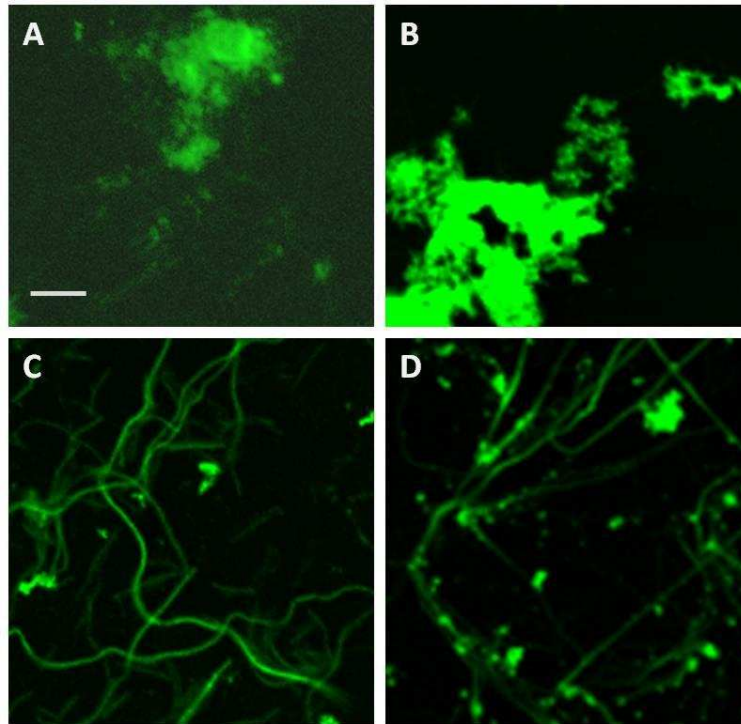


Abb. 19:

Confocal Laser Scanning Microscopy: *Capnocytophaga gingivalis* nach 30 min Inkubation mit verschiedenen Chitosan-Derivaten: FITC-OCMC (A), FITC-CMC (B), FITC-TMC (C) und FITC-TGA (D). Der weisse Balken entspricht 5 μ m.

FITC-TMC und FITC-TGA lagerten sich hingegen an die Bakterien an und bewirkten ein gut erkennbares Fluoreszenz-Signal im Grünbereich (Abb. 19, C und D). Auch diese beiden Chitosane bildeten – wenn auch deutlich kleinere – Präzipitate nach Verdünnung im Kulturmedium.

Des Weiteren wurde der Effekt einer gleichzeitigen PDT mit HYP oder FOS und den verschiedenen Chitosan-Derivaten an *C. gingivalis* untersucht.

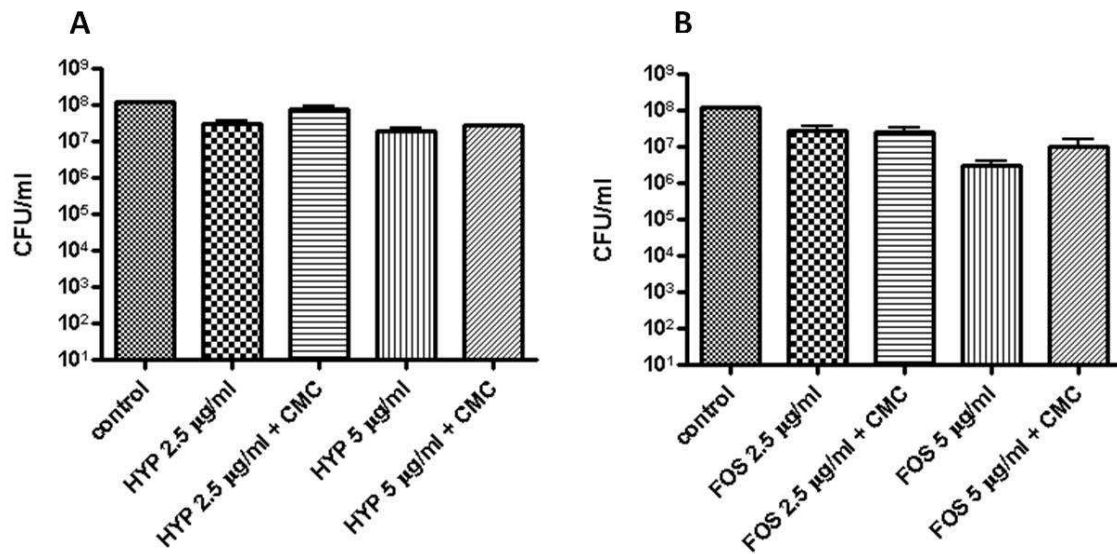


Abb. 20:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 15 min Inkubation mit 2.5 und 5 µg/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) und CMC (Endkonzentration 4mg/ml).

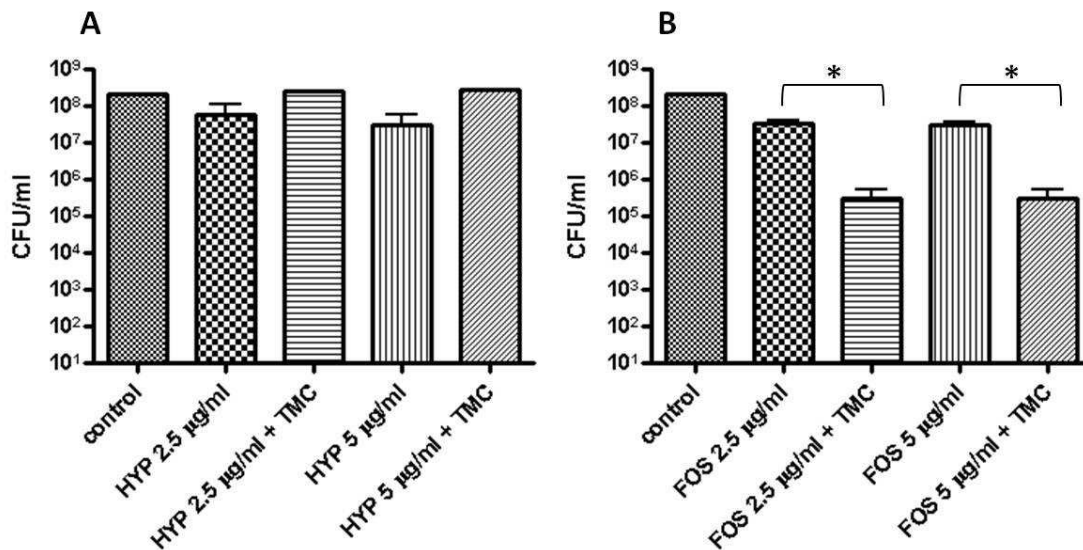


Abb. 21:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 15 min Inkubation mit 2.5 und 5 µg/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) und TMC (Endkonzentration 4mg/ml). * $p < 0.05$.

CFU-Assays zeigten, dass CMC eine PDT mit keinem der Photosensibilisatoren HYP oder FOS signifikant verbessern konnte (Abb. 20). Prinzipiell fand sich sogar der (nicht-signifikante) Trend, die PDT durch Zusatz dieses Chitosans zu verschlechtern.

Die Kombination von TMC mit HYP-PDT zeigte vergleichbare Resultate (Abb. 21, A): auch hier führte der Zusatz des Chitosans nicht zu einer Verbesserung, sondern tendenziell zu einer Verschlechterung des PDT-Erfolgs. Im Gegensatz dazu konnte der Zusatz von TMC die FOS-PDT signifikant verbessern (Abb. 21, B).

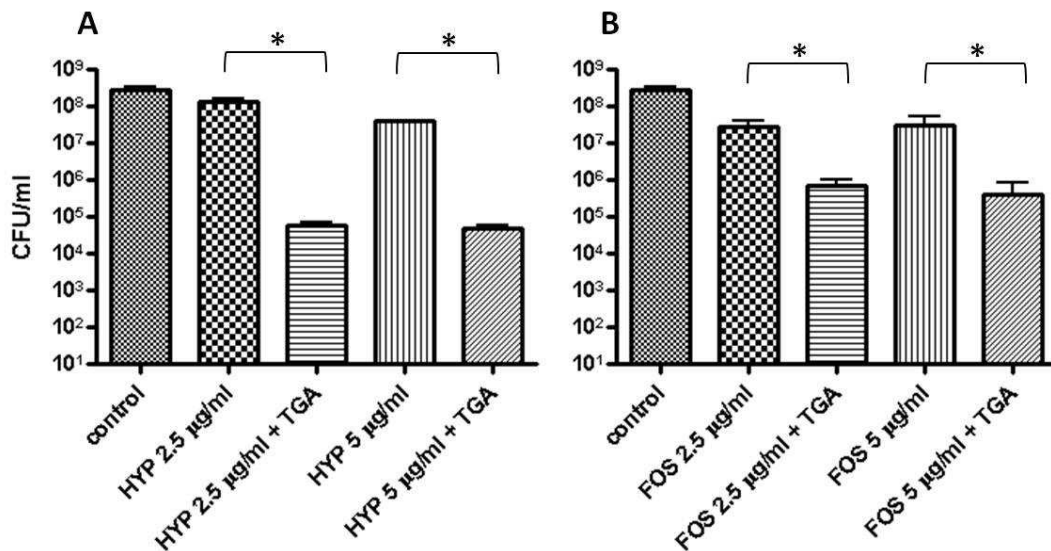


Abb. 22:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 15 min Inkubation mit 2.5 und 5 µg/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) und TGA (Endkonzentration 4mg/ml). * $p < 0.05$.

Die Kombinationen von TGA (Abb. 22) oder OCMC (Abb. 23) mit HYP- oder FOS-mediierter PDT führte immer zu einer Verbesserung des PDT-Effekts. Während nach Zusatz von TGA aber noch eine biologisch relevante Zahl von $>10^4$ (HYP-PDT) oder $>10^5$ (FOS-PDT) CFU nachzuweisen war, fanden sich nach Beigabe von OCMC bei beiden PDT-Protokollen keine überlebenden Kolonien.

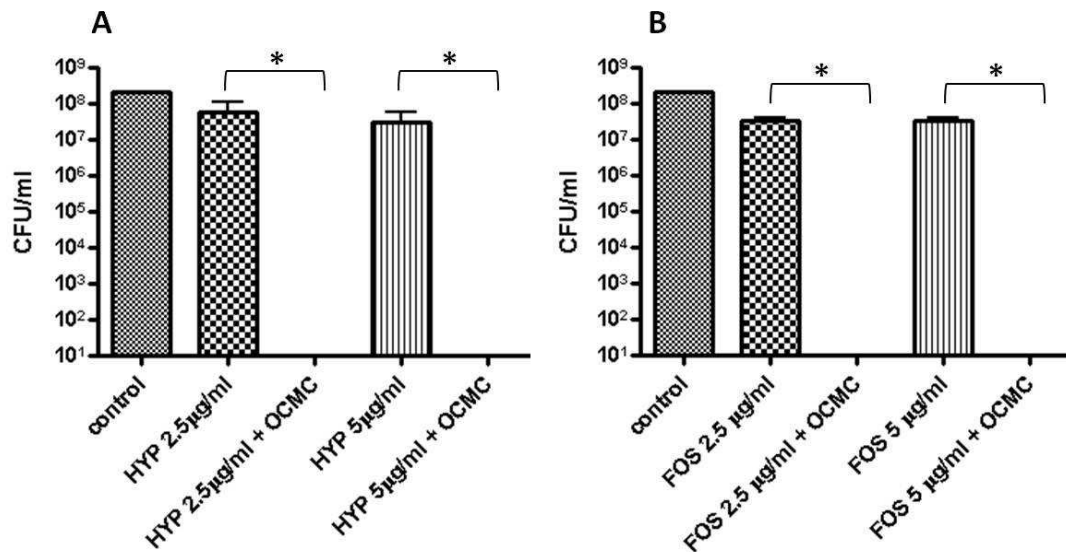


Abb. 23:

Colony Forming Assays: photodynamischer Effekt auf *Capnocytophaga gingivalis* nach 15 min Inkubation mit 2.5 und 5 µg/ml Hypericin (HYP; A) oder Foslipos (FOS; B) und OCMC (Endkonzentration 4mg/ml). * $p < 0.05$.

4. Diskussion

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass PDT nicht nur erfolgreich zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden kann, sondern auch eine vielversprechende antimikrobielle Behandlungsoption darstellt. Von grossem klinischem Interesse ist hierbei insbesondere, dass PDT das Potenzial zur Therapie schwieriger oder antibiotika-resistenter Stämme besitzt. Der Einsatz der antimikrobiellen PDT in der täglichen Praxis ist zur Zeit jedoch limitiert. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, dass nicht alle Mikroorganismen gleich empfindlich auf PDT reagieren. Während gezeigt werden konnte, dass gram-positive Bakterien mit einer Vielzahl der chemisch unterschiedlichen Photosensibilisatoren interagieren und abgetötet werden können, erwiesen sich die PDT-Effekte für die Behandlung von gram-negativen Bakterien als weitaus unzuverlässiger. Erst durch die Entwicklung von kationischen Photosensibilisatoren hat sich diese Situation kürzlich teilweise verbessert^{47, 48}. Man vermutet, dass die erhöhte Wirkung kationischer Photosensibilisatoren durch ihre Affinität zu anionischen Zellwand-Komponenten der gram-negativen Bakterien und Pilzen erklärt werden kann^{47, 48}.

Leider eignen sich viele der modernen und hochwirksamen Photosensibilisatoren (d.h. solche mit höchsten Singulett-Sauerstoff Quantum Yield) aufgrund ihrer

Ladungseigenschaften nicht für die antimikrobakterielle Breitband-PDT. Dies trifft auch auf das mTHPC oder das Hypericin zu, welche beide eine negative Ladung aufweisen. Auch die kürzlich entwickelte liposomale mTHPC-Formulierung Foslipos besitzt „nur“ eine neutrale Ladung und ist somit nach gängiger Sicht nicht optimal zur antimikrobiellen PDT geeignet. Entsprechend wurde vor kurzem gezeigt, dass sowohl Foslipos, als auch Hypericin effektiv zur PDT von gram-positiven *S. mutans* und *sobrinus* verwendet werden können⁴⁶. PDT mit mTHPC war ausserdem erfolgreich zur Therapie von gram-positiven *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus*⁸²⁻⁸⁴. Hypericin-PDT war wirksam gegen gram-positive *Listeria monocytogenes* und *S. aureus*, verschiedene Mycobakterien und *Bacillus subtilis*^{82, 85, 86}. Die Effizienz von Foslipos und Hypericin waren beim gram-negativen *Fusobacterium nucleatum* jedoch sehr stark reduziert (Besic Gyenge *et al.*, unveröffentlicht). Des weiteren zeigte Hypericin bei den gram-negativen Keimen *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* keine relevante Wirkung^{85, 86}.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob neue PDT-Ansätze die Effekte der Photosensibilisatoren Foslipos oder Hypericin für die antimikrobielle Therapie verbessern können. Im Speziellen sollte das Potential einer Kombination der mTHPC- oder Hypericin-medierten PDT mit Chitosan getestet werden.

Chitosan ist ein polykationisches Biopolymer, das durch Deazetylierung aus Chitin gewonnen wird. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Chitosan selber antimikrobielle Aktivitäten besitzt, die auch gegenüber gram-negativen Stämmen und Pilzen wirksam sind⁸¹ und somit die Wirkungen der Photosensibilisatoren unterstützen würden.

Am gram-positiven Keim *S. sobrinus* haben wir zunächst die PDT-Wirkungen von FOS und HYP bestätigt. Unsere Ergebnisse stimmen mit einer früheren Studie überein, bei welcher ebenfalls eine umfassende PDT-Wirkung mit diesen Photosensibilisatoren an diesem Keim beschrieben wurde⁴⁶. Der gram-negative Keim *C. gingivalis* hingegen zeigt keine Sensibilität gegenüber FOS- oder HYP-vermittelter PDT. Die unterschiedlichen Effekte von HYP und FOS auf die beiden Keime korrelierten nicht mit dem mikroskopischen Bild. Fluoreszenzmikroskopisch waren beide Photosensibilisatoren nämlich an beiden Keimen gut detektierbar. Da für diese Studien aber eine Labelling der Chitosane mit FITC notwendig war, können wir nicht ausschliessen, dass diese Modifikation eine Veränderung im Bindungsverhalten der Chitosane nach sich zog. Es ist zu vermuten, dass die fehlende Wirkung der PDT auf *C. gingivalis* auf die Ladungen der Photosensibilisatoren (negativ, bzw. neutral) zurückzuführen ist. Wie bereits oben erwähnt, gelten positiv geladene Photosensibilisatoren als besser geeignet für die antibakterielle Behandlung^{47, 48}. Während unsere Studie die erste ist, welche die PDT-Wirkungen von FOS und HYP an *Capnocytophaga* getestet hat, wurde zuvor eine Studie publiziert, die zeigt, dass *Capnocytophaga spp.* mit den Photosensibilizern chlorin e6 und BLC 1010 komplett abgetötet

werden können⁸⁷. Diese gegensätzlichen Wirkungen der Photosensitizer ist wahrscheinlich auf ihre chemische Zusammensetzung (mit einer positiven Ladung) und der damit induzierten Interaktion mit der gram-negativen Zellwand zurückzuführen⁴⁸. Ziel war es wohlgerne in unserem Fall, PDT-Bedingungen zu wählen, bei welchen noch genügend Keime überleben, um eine zusätzliche Wirkungsverbesserung durch Chitosane zeigen zu können.

Als nächstes haben wir die alleinige Wirkung der Chitosan-Derivate TMC, CMC und TGA untersucht. Zahlreiche Studien haben zuvor gezeigt, dass Chitosan prinzipiell Keime abtöten kann^{88, 89}. Man geht aber davon aus, dass Chitosane besser gegenüber gram-positiven, als gegenüber gram-negativen Bakterien wirken⁹⁰. Vorangehende Studien wiesen nach, dass die Mechanismen der Chitosan-Wirkung auf der Adhärenz positiv-geladener freier Amino-Gruppen der Chitosane an anionische mikrobielle Zellwandbestandteile basiert, was eine fatale Beeinträchtigung der Barriereintegrität zur Folge hat^{81, 91-94}. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse aber, dass nicht grundsätzlich alle Chitosane als antibakterielle Substanzen wirksam sind.

Die antimikrobielle Wirkung von Chitosan wurde für eine Vielzahl gram-positiver Keime, einschliesslich *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* und *L. bulgaricus* gezeigt⁹⁵. Insgesamt sind aber nur wenige Studien mit Streptokokken durchgeführt worden. In einer früheren Studie mit nicht modifiziertem Chitosan konnte aber lediglich eine biologisch nicht relevante Reduktion von *S. sobrinus* erreicht werden⁷². Auch bei der verwandten kariogenen Spezies *S. mutans* bewirkten nicht-modifizierte Chitosane lediglich eine Wachstumsreduktion^{68, 71, 72, 96-100}. Allerdings hängen diese Effekte sehr wahrscheinlich nicht nur von Chitosan selber ab, sondern auch von den Behandlungsprotokollen. So wurde berichtet, dass eine Elimination von *S. mutans* mit nicht modifiziertem Chitosan nur erreicht werden konnte, wenn die Bakterien in der Adhäsionsphase waren¹⁰¹.

Wachstumshemmungen gram-negativer Bakterien durch native Chitosane mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad und deren Modifikationen wurden ebenfalls beschrieben und umfasst unter anderem die Keime *Pseudomonas fluorescens* und *Escherichia coli*^{73, 91, 93-95, 102-104}. Über die Wirkung von Chitosan auf *Capnocytophaga* ist zur Zeit nichts publiziert. Unsere Ergebnisse zu diesem Keim sind deshalb die ersten ihrer Art, zeigen aber überraschenderweise, dass die Derivate TMC, CMC und TGA nicht wirksam sind. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, könnte aber unter Umständen (auch) mit unseren Inkubationsbedingungen zusammenhängen. Im Unterschied zu den genannten Chitosanen, war OCMC bei *C. gingivalis* maximal effektiv. Der Grund hierfür ist ebenfalls nicht geklärt, zumal keine weiteren Daten zur antimikrobiellen Wirkung dieses Derivats vorliegen.

In unserer Studie haben wir festgestellt, dass TGA eine Aggregation der Bakterien induzierte, vor allem bei der gram-negativen Spezies. Ein solches Verhalten wurde schon zuvor für verschiedene Chitosan-Derivate beschrieben^{69, 105-107} und scheint mit schädlichen Einflüssen auf die Zellwand assoziiert zu sein¹⁰⁵. Da schon seit langem bekannt ist, dass die Bildung von Biofilmen durch vorgängige Bakterienaggregation verhindert wird,¹⁰⁸ vermuten wir, dass dieser TGA-Effekt vorteilhaft für eine spätere Therapie sein könnte.

Man geht davon aus, dass elektrostatische Interaktionen zwischen Chitosan und der Zellwand wichtig sind für die Chitosanwirkung. Insgesamt sollen kationische Substanzen von Vorteil sein, da sie an negativ geladene Zellwandbestandteile binden können^{47, 48}. In vorgängigen Studien wurde das Zeta-Potential der von uns verwendeten Chitosan-Derivate untersucht. Dort zeigte sich, dass CMC ein Zeta-Potential von -15 mV, TMC eines von +40 mV und TGA eines von +7 mV besitzt (persönliche Mitteilung, G. Geisberger). Unsere Ergebnisse stehen somit in Widerspruch zur vorherrschenden Lehrmeinung, da wir zeigen konnten, dass das hoch-positive TMC keinesfalls die besten antimikrobiellen Effekte hatte. Auch die mikroskopischen Beobachtungen zeigten keine grundsätzliche bevorzugte Akkumulation von TMC an den Bakterien. Bei *S. sobrinus* waren die Fluoreszenz-Signale von TMC gering, während die stärkste Anlagerung bei TGA zu beobachten war, einem Derivat mit eher schwacher positiver Ladung. Bei *C. gingivalis* hingegen wurden starke Signale von TMC an den Bakterien detektiert, aber die Signalintensität war bei TGA etwa vergleichbar. Wir schliessen daraus, dass die vorherrschende Hypothese bezüglich der besseren Wirkung kationischer Chitosane nicht allgemein zutrifft. Man muss davon ausgehen, dass weitere, noch undefinierte Prozesse eine Rolle für die antimikrobielle Wirkung von Chitosan spielen müssen.

Ungeachtet einer weitgehend fehlenden Wirkung der Chitosan-Derivate alleine, zeigen unsere Ergebnisse, dass Chitosane in der Tat die PDT verbessern können. Dies hängt allerdings vom verwendeten Derivat und dem Keim ab. So konnten wir zeigen, dass die Kombination von PDT und TGA bei beiden untersuchten Keimen den photodynamischen Effekt signifikant verstärken konnte. Dies traf auf beide Photosensibilisatoren zu und scheint somit eventuell ein universeller Effekt zu sein. Zusätzliche Untersuchungen mit diesem vielversprechenden Derivat an anderen Keimen wären deshalb lohnenswert. Die Überlegenheit thiolierter Chitosane für antimikrobielle Anwendungen wurde auch kürzlich an gram-positiven, gram-negativen Bakterien und an *Candida albicans* gezeigt¹⁰⁹.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von TGA erwies sich die Kombination der anderen Chitosane und PDT als komplex und insgesamt weniger empfehlenswert. Die Zugabe von CMC zur PDT war bei beiden Keimen und beiden Photosensibilisatoren kontraproduktiv (d.h. die Wirkung verschlechtert wurde). Zwar war dieser Effekt nur bei *S. sobrinus* statistisch signifikant, aber auch bei *C. gingivalis* als Trend erkennbar.

Die Effekte von TMC plus PDT waren schwer darstellbar, da TMC eine markante Tendenz zum Aggregieren zeigte. Es wurden deshalb Tests mit nur einem Keim angestrengt (*C. gingivalis*). Die Ergebnisse zeigten eine Photosensibilisator-Abhängigkeit: bei Kombination mit HYP-PDT war kein signifikanter Effekt zu verzeichnen, während bei Kombination mit FOS-PDT der PDT-Effekt signifikant verbessert werden konnte.

Die komplett bakterizide Wirkung der Kombination von OCMC und PDT ist eindeutig auf die bakterizide Wirkung von OCMC alleine zurückzuführen. Eine Kombination macht hierbei also keinen Sinn und OCMC könnte besser als Monotherapie eingesetzt werden. Allerdings sollte bemerkt werden, dass die Kombination von OCMC und PDT auch nicht zu einer Verschlechterung der PDT führte, wie wir das bei einigen anderen Chitosanen beobachten konnten (siehe oben).

Bis jetzt sind nur wenige Studien zur Kombination von Chitosan und PDT publiziert worden. Kürzlich wurde gezeigt, dass unmodifiziertes Chitosan die PDT mit Hematoporphyrin oder Toluidinblau bei den Behandlungen von gram-positiven *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* und von gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* verbesserte⁶⁷. Auch in dieser Studie hatte Chitosan alleine keinen antibakteriellen Effekt. Eine andere Studie stellte fest, dass Chitosan-Partikel, welche mit dem Photosensibilisator Photogem versetzt waren, eine geringere Wirksamkeit gegen *S. aureus* aufwiesen, als Photogem in Lösung¹¹⁰. Diese Ergebnisse wurden jedoch ohne Lichtbestrahlung erzielt, und sie wurden durch die Interaktion von negativ-geladenen Photogemgruppen mit positiven-geladenen Chitosan-Resten erklärt¹¹⁰. In einer weiteren Studie verbesserte ein Konjugat zwischen Bengalrosa und Chitosan (CSRP) den photodynamischen Effekt auf dentalen Biofilm (*enterococcus faecalis*). Zudem wies CSRB-modifiziertes Dentin-Kollagen eine höhere Beständigkeit gegen Kollagenase-Degradation auf¹¹¹. Lichtaktivierte CSRP-Partikel könnten demnach einen interessanten Ansatz zur Behandlung von infiziertem Dentin bieten.

Die Wirkungen einer Kombination von Chitosanen und PDT sind zur Zeit schwer zu erklären, - unter anderem auch deshalb, weil die Beobachtungen so unterschiedlich sind. So ist z.B. nicht klar, ob die Kombinationen eventuell die benötigten Wellenlängen zur Anregung der Photosensibilisatoren (für FOS: 652 nm und für HYP: 593 nm) verändern. Des Weiteren könnte Chitosan aufgrund seiner lipid-bindenden Eigenschaften¹¹² eventuell mit liposomalem FOS in Interaktion treten und dessen PDT-Eigenschaften verändern. Es scheint jedenfalls, dass der Bakterien-Stamm eine wichtige Rolle spielt. Eine weitere wichtige Frage wäre nach Veränderungen im Zelltod-Modus bei der Kombinationsbehandlung.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass unsere Studie einen ersten Nachweis für eine erfolgversprechende Kombination von TGA und PDT für die antimikrobielle Behandlung liefert. Mit solchen kombinierten Verfahren könnten geringere Mengen der Photosensibilisatoren verwendet werden und damit würden sowohl Nebenwirkungen, als auch Kosten der PDT reduziert. Da PDT nach gängiger Ansicht nicht zur Entwicklung von antimikrobiellen Resistenzen führt⁴⁸, stellt unsere PDT-Kombination mit TGA eine interessante Perspektive für spätere klinische Anwendungen dar. Hierfür sind allerdings noch weiterführende Tests, z.B. hinsichtlich der Wirksamkeit gegenüber weiteren Keimen, notwendig. Ausserdem ist nichts bekannt über das Potential von TGA, Resistenzentwicklungen zu fördern (oder zu verhindern), sowie über die genauen Wirkmechanismen und eventuellen Nebenwirkungen dieses Derivats.

Odontogene Infektionen sind typischerweise polymikrobiell. Deshalb könnte ihre Behandlung von einer PDT-Chitosan-Kombination profitieren, welche sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien wirksam sind. Verglichen mit unmodifizierten Chitosanen zeichnen sich thiolisierte Chitosane (einschliesslich Chitosan-TGA) sowohl durch verbesserte Mukoadhäsion als auch durch bessere Löslichkeit und Diffusionspermeabilität aus^{113, 114} und bieten deshalb interessante Optionen für lokale PDT Behandlungen von Infektionen innerhalb der Mundhöhle.

5. Referenzen

1. Marsh P. *Orale Mikrobiologie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1999
2. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.
3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5721-32.
4. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res*. 2005;3:176-85.
5. Hardie JM, Bowden GH. The normal microbial flora of the mouth. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1974;3:47-83.
6. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*. 2011;18:109-20.
7. Haug RH. Microorganisms of the nose and paranasal sinuses. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2012;24:191-6, vii-viii.
8. Sansonetti PJ. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol*. 2010;4:8-14.
9. Frazelle MR, Munro CL. Toothbrush contamination: a review of the literature. *Nurs Res Pract*. 2012;2012:420630.
10. Khammissa RA, Feller L, Meyerov R et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: bacterial infection. *SADJ*. 2012;67:70, 72-4.
11. Hujoel P, Zina L, Cunha-Cruz J et al. Specific infections as the etiology of destructive periodontal disease: a systematic review. *Eur J Oral Sci*. 2013;121:2-6.
12. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res*. 2012;14:87-94.
13. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL et al. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9:311-23.
14. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*. 2011;2:435-44.
15. Peterson L, AT I, RD M et al. (eds). *Principles of oral and maxillofacial surgery*, Vol. 2. Philadelphia, JB Lippincott Company 2005.

16. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. Clin Microbiol Infect. 2007;13 Suppl 4:3-10.
17. Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC, 3rd et al. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. Mol Oral Microbiol. 2010;25:305-16.
18. Roda PR, Bagan JV, Bielsa JMS et al. Antibiotic use in dental practice. A review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007;12:186-92.
19. Goud S, Nagesh L, Fernandes S. Are we eliminating cures with antibiotic abuse? A study among dentists. Nigerian Journal of Clinical Practice. 2012;15:151-55.
20. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. Anaerobe. 2012;18:576-80.
21. Yoshinari N, Tohya T, Kawase H et al. Effect of repeated local minocycline administration on periodontal healing following guided tissue regeneration. J Periodontol. 2001;72:284-95.
22. Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnmedizin*, Vol. 4. München, Urban & Fischer, 2007.
23. Schwenzer N, Ehrenfeld M. *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde*, Vol. 4. Stuttgart, Thieme Verlag, 2008.
24. Abubaker AO. Use of prophylactic antibiotics in preventing infection of traumatic injuries. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2009;21:259-64, vii.
25. Alexander RE, Grogan DM. Clinical perspectives on the new prophylactic antibiotic protocols prior to dental procedures. Tex Dent J. 2007;124:1102-10.
26. Lodi G, Figini L, Sardella A et al. Antibiotics to prevent complications following tooth extractions. Cochrane Database Syst Rev. 2012;11:CD003811.
27. Angebault C, Andremont A. Antimicrobial agent exposure and the emergence and spread of resistant microorganisms: issues associated with study design. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012.
28. van Duijn PJ, Dautzenberg MJ, Oostdijk EA. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. Curr Opin Crit Care. 2011;17:658-65.
29. Livermore DM. Fourteen years in resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:283-94.

30. Ackroyd R, Kelty C, Brown N et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001;74:656-69.
31. Mettraux G, Husler J. [Implementation of transgingival antibacterial photodynamic therapy (PDT) supplementary to scaling and root planing. A controlled clinical proof-of-principle study]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011;121:53-67.
32. Kaufmann C. Neuer Ansatz in der Photodynamischen Therapie. [serial on the Internet] 2011 [cited].
33. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46:24-9.
34. Palumbo G. Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert Opin Drug Deliv.* 2007;4:131-48.
35. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod.* 2010;36:322-8.
36. Agostinis P, Berg K, Cengel KA et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:250-81.
37. Sharma SK, Mroz P, Dai T et al. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr J Chem.* 2012;52:691-705.
38. Soukos NS, Chen PS, Morris JT et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006;32:979-84.
39. Biel MA. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections. *Methods Mol Biol.* 2010;635:175-94.
40. Braham P, Herron C, Street C et al. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol.* 2009;80:1790-8.
41. Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J et al. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:735-40.
42. Tilman. Antimikrobielle Photodynamische Therapie. [serial on the Internet] 2009 [cited].
43. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6:170-88.

44. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25:487-504.
45. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86:694-707.
46. Lüthi M, Besic Gyenge E, Engström M et al. Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Medical Laser Application.* 2009;227-36.
47. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25:505-19.
48. Jori G, Fabris C, Soncin M et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38:468-81.
49. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2010;55:143-66.
50. Fontana CR, Abernethy AD, Som S et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009;44:751-9.
51. Ng R, Singh F, Papamanou DA et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod.* 2011;37:217-22.
52. Ng WW, Wu ZH, Lai TY. Half-dose verteporfin photodynamic therapy for bullous variant of central serous chorioretinopathy: a case report. *J Med Case Rep.* 2011;5:208.
53. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci.* 2011;27:389-95.
54. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011;38:1106-14.
55. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol.* 2009;80:98-105.
56. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T et al. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2007;52:290-4.
57. Keegan GM, Smart JD, Ingram MJ et al. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. *J Dent.* 2012;40:229-40.

58. Je JY, Kim SK. Chitosan as potential marine nutraceutical. *Adv Food Nutr Res.* 2012;65:121-35.
59. Valencia-Chamorro SA, Palou L, Del Rio MA et al. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51:872-900.
60. Dai T, Tanaka M, Huang YY et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9:857-79.
61. Francesko A, Tzanov T. Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010;125:1-27.
62. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J Control Release.* 2012;161:496-504.
63. Jarmila V, Vavrikova E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities--a review. *Curr Pharm Des.* 2011;17:3596-607.
64. Hayes M, Carney B, Slater J et al. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan--Part A: extraction methods. *Biotechnol J.* 2008;3:871-7.
65. Pierre Jollès RAAM. *Chitin and Chitinases.* Basel, Birkhäuser Verlag 1999.
66. Hänsel R, Sticher O. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 9. Auflage edn. Heidelberg, Springer Medizin Verlag 2010.
67. Tsai T, Chien HF, Wang TH et al. Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1883-90.
68. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ et al. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18:553-7.
69. Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T et al. Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2001;42:243-9.
70. Virga C, Beltramo D, Landa C et al. A comparative study in vivo of the therapeutic effect of triclosan, hexetidine and chitosan. *Acta Odontol Latinoam.* 2002;15:3-9.
71. Bae K, Jun EJ, Lee SM et al. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Investig.* 2006;10:102-7.

72. Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJ et al. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:493-5.
73. Sarasam AR, Brown P, Khajotia SS et al. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:1083-90.
74. Ji QX, Zhong de Y, Lu R et al. In vitro evaluation of the biomedical properties of chitosan and quaternized chitosan for dental applications. *Carbohydr Res.* 2009;344:1297-302.
75. Norowski PA, Jr., Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88:530-43.
76. Mohire NC, Yadav AV. Chitosan-based polyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. *Indian J Dent Res.* 2010;21:380-4.
77. Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D et al. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent.* 2011;39:218-24.
78. Vinsova J, Vavrikova E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. *Curr Pharm Des.* 2008;14:1311-26.
79. Xu T, Xin M, Li M et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan. *Carbohydr Res.* 2011;346:2445-50.
80. Zaki NM, Hafez MM. Enhanced antibacterial effect of ceftriaxone sodium-loaded chitosan nanoparticles against intracellular *Salmonella typhimurium*. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13:411-21.
81. Kong M, Chen XG, Xing K et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010;144:51-63.
82. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci.* 2010;9:365-9.
83. Kranz S, Guellmar A, Volpel A et al. Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. *Lasers Surg Med.* 2011;43:241-8.
84. Yow CM, Tang HM, Chu ES et al. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012;88:626-32.
85. Kairyte K, Lapinskas S, Gudelis V et al. Effective inactivation of food pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* by combined treatment of hypericin-based photosensitization and high power pulsed light. *J Appl Microbiol.* 2012;112:1144-51.

86. Mortensen T, Shen S, Shen F et al. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytother Res.* 2012;26:1327-33.
87. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V et al. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004;75:1343-9.
88. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol.* 2008;43:401-14.
89. Ballal N, Kundabala M, Bhat K et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* to Chitosan, Chlorhexidine gluconate and their combination in vitro. *Aust Endod J.* 2009;35:29-33.
90. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol.* 2009;2:186-201.
91. Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:235-44.
92. Liu H, Du Y, Wang X et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.* 2004;95:147-55.
93. Je JY, Kim SK. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J Agric Food Chem.* 2006;54:6629-33.
94. Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol.* 2008;99:2806-14.
95. No HK, Park NY, Lee SH et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 2002;74:65-72.
96. Fujiwara M, Hayashi Y, Ohara N. Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*. *New Microbiol.* 2004;27:83-6.
97. Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T et al. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2003;44:9-16.
98. Virga C, Landa C, Beltramo D et al. Low and high molecular weight chitosans interactions with *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Acta Odontol Latinoam.* 2003;16:9-16.
99. Sarasam AR, Krishnaswamy RK, Madihally SV. Blending chitosan with polycaprolactone: effects on physicochemical and antibacterial properties. *Biomacromolecules.* 2006;7:1131-8.

100. Chavez de Paz LE, Resin A, Howard KA et al. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:3892-5.
101. Pasquantonio G, Greco C, Prenna M et al. Antibacterial activity and anti-biofilm effect of chitosan against strains of *Streptococcus mutans* isolated in dental plaque. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21:993-7.
102. Naberezhnykh GA, Gorbach VI, Likhatskaya GN et al. Interaction of chitosans and their N-acylated derivatives with lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73:432-41.
103. El-Sharif AA, Hussain MH. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Microbiol.* 2010;62:739-45.
104. Tang H, Zhang P, Kieft TL et al. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomater.* 2010;6:2562-71.
105. Didenko LV, Gerasimenko DV, Konstantinova ND et al. Ultrastructural study of chitosan effects on *Klebsiella* and *staphylococci*. *Bull Exp Biol Med.* 2005;140:356-60.
106. Simunek J, Tishchenko G, Hodrova B et al. Effect of chitosan on the growth of human colonic bacteria. *Folia Microbiol (Praha).* 2006;51:306-8.
107. Raafat D, von Barga K, Haas A et al. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:3764-73.
108. Liljemark WF, Bloomquist CG, Germaine GR. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun.* 1981;31:935-41.
109. Geisberger G, Gyenge EB, Hinger D et al. Chitosan-thioglycolic acid as a versatile antimicrobial agent. *Biomacromolecules.* 2013;14:1010-7.
110. Fontana CR, dos Santos DS, Jr., Bosco JM et al. Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery. *Drug Deliv.* 2008;15:417-22.
111. Shrestha A, Hamblin MR, Kishen A. Characterization of a conjugate between Rose Bengal and chitosan for targeted antibiofilm and tissue stabilization effects as a potential treatment of infected dentin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4876-84.
112. Rodriguez MS, Albertengo LE. Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69:2057-62.
113. Bernkop-Schnurch A, Weithaler A, Albrecht K et al. Thiomers: preparation and in vitro evaluation of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system. *Int J Pharm.* 2006;317:76-81.

114. Werle M, Bernkop-Schnurch A. Thiolated chitosans: useful excipients for oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60:273-81.

6. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Rudolf Gmür (Institut für Orale Biologie, Zentrum für Zahnmedizin, UniversitätsSpital Zürich) für die Zuverfügungstellung der Keime, sowie Martin Gander und Helga Lüthi-Schaller (Institut für Orale Biologie, Zentrum für Zahnmedizin, UniversitätsSpital Zürich) für die geduldige Einarbeitung in Labortechniken.

Frau Dr. Emina Besic Gyenge danke ich für die exzellente Einführung in die Methoden der PDT.

Die Arbeit wurde unterstützt durch einen Grant der Schweizerischen Zahnärzte-Gesellschaft.